

**EDSON DOS SANTOS SILVA**

**ESTUDO DE MARCADORES IMUNOLÓGICOS EM CÉLULAS *Natural Killer* – NK  
EM HOMENS E MULHERES SAUDÁVEIS**

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA  
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA  
CURSO DE BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

João Pessoa

2020

**EDSON DOS SANTOS SILVA**

**ESTUDO DE MARCADORES IMUNOLÓGICOS EM CÉLULAS *Natural Killer* – NK  
EM HOMENS E MULHERES SAUDÁVEIS**

Monografia apresentada ao Curso de Ciências Biológicas (Trabalho Acadêmico de conclusão de Curso), como requisito parcial à obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas da Universidade Federal da Paraíba.

Nome do(a) Orientador(a): Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Tatjana Keesen de Souza Lima Clemente

Co-orientador(a): Prof<sup>a</sup> Ms<sup>a</sup> Rephany Fonseca Peixoto

João Pessoa

2020

S586e Silva, Edson dos Santos.

Estudo de marcadores imunológicos em células Natural  
Killer NK em homens e mulheres saudáveis / Edson dos  
Santos Silva. – João Pessoa, 2020.  
66 f. : il.

Orientação: Tatjana Keesen de Souza Lima Clemente.  
Coorientação: Rephany Fonseca Peixoto.  
Monografia (Graduação) - UFPB/CCEN.

1. Citotoxicidade. 2. Linfócitos. 3. Receptor de células  
NK. I. Clemente, Tatjana Keesen de Souza Lima. II.  
Peixoto, Rephany Fonseca. III. Título.

UFPB/BC

**EDSON DOS SANTOS SILVA**

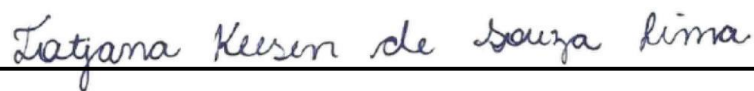
**ESTUDO DE MARCADORES IMUNOLÓGICOS EM CÉLULAS *Natural Killer* – NK  
EM HOMENS E MULHERES SAUDÁVEIS**

Monografia apresentada ao Curso de  
Ciências Biológicas, como requisito  
parcial à obtenção do grau de Bacharel  
em Ciências Biológicas da Universidade  
Federal da Paraíba.

Data: **27/03/2020**

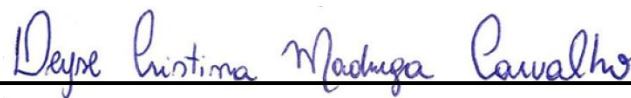
Resultado: **Aprovado**

**BANCA EXAMINADORA:**



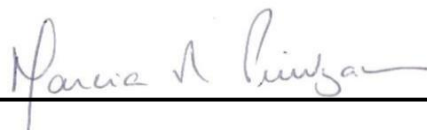
---

Profª Drª Tatjana Keesen de Souza Lima Clemente, UFPB



---

Profª Msª Deyse Cristina Madruga Carvalho, UFPB



---

Profª Drª Márcia Regina Piuvezam, UFPB

*A Deus e a minha família dedico este trabalho, a pessoa que sou hoje foi inteiramente formada imagem e semelhança da junção de ambos. Gratidão eterna por esse presente recebido, vossas presenças durante esta jornada tornaram tudo mais fácil.*

## AGRADECIMENTOS

À **Deus** seja dada toda honra, toda glória e todo louvor. Uma das coisas que aprendi e tenho aprendido é que nada, absolutamente nada acontece sem um propósito, e aqui se realiza uma promessa feita no ano de 2013, as lágrimas rolaram, a felicidade bateu em minha porta, as complicações me derrubaram, o desejo de vencer me colocou de pé, mas tudo tinha um propósito, que foi me fazer crescer. Então primeiramente eu agradeço a Ele por estar comigo, mesmo quando eu não o avistava.

Gratidão eterna também a minha **mãe Marlene**, agradecer a senhora sempre vai me emocionar, a senhora sempre me estimulou a ser o melhor filho, melhor amigo, melhor irmão, melhor aluno, melhor companheiro.

**Emanuel, Daniel, Sara, Abraão e Emerson**, mesmo sendo meus irmãos, sempre os considerearei como filhos, então sou muito grato por todas as brincadeiras e risos, sou sortudo por todas as brigas e pedidos de desculpa, enfim vocês tornaram minha vida mais florida.

Aos **meus familiares**, tios, avós, primos, que foram essenciais na minha trajetória acadêmica.

A existência de pessoas que conquistaram espaço no meu coração em João pessoa, foi iniciado por vocês, **meu eterno 2015.2**, a vocês eu dedico este paragrafo de agradecimento, pois foram com vocês que eu obtive boa parte das melhores experiências, cresci pessoalmente, percebi o mundo com olhos diferentes, chorei e sorri, amei e fui amado, dei trabalho mas também fui cuidador e acolhedor. Desejo trajetórias incríveis e interações surpreendentes, todos vocês merecem o melhor que esta vida pode oferecer.

Ao meu amigo **Flávio Vieira**, esse ser humano dotado da capacidade de altruísmo sem hipocrisia. Conhecer você fez-me sentir um turbilhão de emoções, tu és a pessoa que ao mesmo tempo que é brisa, também é furacão, ao mesmo tempo que é doce, é salgado, ao mesmo tempo que é abraço, é afastar-se do abraço. Agradeço ao companheirismo durante toda esta trajetória.

E nessa trajetória eu tenho aprendido que a vida ela continua seguindo sempre, então à uma das pessoas que têm me ensinado que viver sempre será difícil, mas depende da minha perspectiva de como olhar a dificuldade. **Edson Pedro**, obrigado por sempre defender a ideia de que todos nós podemos ser uma pessoa melhor que

ontem. Obrigado por sempre falar: Não é hora de cobrar mais de você, é hora de fazer e fazer bem feito. A finalização deste trabalho e parte do mérito dedico a você.

Ao lugar que me senti acolhido por todos e todas, aos que me fizeram sentir em casa, aos que me aceitaram e me abraçaram de uma forma inesquecível, a **Família LABIDIC**, nesses últimos anos eu realmente entendi que a vida é feita de encontros e desencontros, e encontrar vocês é comparado a ganhar na loteria, que sorte eu tive de encontrar um grupo que me transborda de alegria.

Sou muito apaixonado pela pessoa da **minha orientadora Tatjana Keesen e co-orientadora Rephany Peixoto**. Então a essas duas mulheres guerreiras, batalhadoras, cientistas maravilhosas dedico meus agradecimentos. Falar de vocês sempre será maravilhoso, é um sentimento semelhante a ouvir o barulho do mar, é algo agradável, que me traz paz, tranquilidade, gratidão, sentimento intenso e verdadeiro. As palavras elas costumam fugir de minha mente quando estou próximo a vocês, então que o meu sorriso e gratidão possam falar por mim em vossas presenças.

A todos **meus professores**, uma das peças principais para meu desenvolvimento como profissional.

A todos **meus amigos e colegas** que contribuíram significativamente para o desenvolvimento deste trabalho, os meus sinceros obrigado.

A **coordenação de Ciências Biológicas**, por sempre estarem prontos para a resolução dos problemas que ocorriam durante a graduação.

Agradeço imensamente a banca examinadora composta pelas professoras Ms<sup>a</sup> **Deyse Cristina Madruga Carvalho** e Dr<sup>a</sup> **Márcia Regina Piuvezam** pela disponibilidade e prazer em disseminar o conhecimento sobre uma forma tão grande de amor, sendo Professoras.

Meus sinceros agradecimentos a todos e meu muito obrigado.

## RESUMO

As células *Natural killer* - NK são linfócitos que se caracterizam pela expressão dos marcadores CD3<sup>-</sup> CD16<sup>+</sup> CD56<sup>+</sup>, que desempenham atividades inatas como defesa antiviral, antimicrobiana e antitumoral, portanto possui uma importância clínica promissora, onde sua atividade no organismo é mediada geralmente por sinais ativadores ou inibitórios. Desse modo a célula NK podem expressar em sua membrana celular receptores de citotoxicidade natural, como por exemplo o NKP44, NKP46 e CD94. Uma vez ativada, essas células podem secretar citocinas como IL-10 e INF- $\gamma$  ou mediar a morte de agentes nocivos pelo processo de degranulação de granzima e perforina. Sabe-se que o dimorfismo sexual tem um papel importante no envolvimento direto sobre o sistema imunológico e sobre as células NK, além disso, o processo de envelhecimento atua de modo a produzir diferenças fisiológicas, resultando em diferenças imunológicas. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar a expressão de marcadores imunológicos de superfície e intracelular das células NK no sexo masculino e no sexo feminino. Diante disso, o sangue periférico de 10 doadores saudáveis foi coletado, sexo masculino (n=5) e sexo feminino (n=4), e posteriormente avaliados por citometria de fluxo. Foram analisadas as variáveis frequência e média de intensidade de fluorescência para expressão dos seguintes marcadores das células NK: NKP44, NKP46, CD94, CD107a, IL-10, INF- $\gamma$ , granzima e perforina em ambos os sexos. Foi observado aumento na frequência populacional das células NK além de maior média de intensidade de fluorescência do CD107a e produção de perforina nos indivíduos do sexo masculino. A expressão e produção de NKP44, NKP46, CD94, IL-10, INF- $\gamma$  e granzima apresentou-se inalterada em ambos os sexos. Deste modo sugere-se que em condições homeostáticas, as células NK podem apresentar diferenças na expressão e/ou intensidade de fluorescência de marcadores constitutivos e importantes para sua função citotóxica, como CD107a e perforina, relacionadas ao dimorfismo sexual. Este trabalho é inédito pois estudos que buscam analisar marcadores imunológicos e suas diferenças de expressão e intensidade de fluorescência no dimorfismo sexual são raros.

Palavras-chave: citotoxicidade, linfócitos, receptor de células NK



## ABSTRACT

Natural killer - NK cells are lymphocytes that are characterized by the expression of CD3<sup>-</sup> CD16<sup>+</sup> CD56<sup>+</sup> markers, which perform innate activities such as antiviral, antimicrobial and antitumor defense, therefore they have a promising clinical importance, where their activity in the body is usually mediated by activating signals or inhibitory. In this way, the NK cell can express natural cytotoxicity receptors on its cell membrane, such as NKP44, NKP46 and CD94. Once activated, these cells can secrete cytokines such as IL-10 and INF- $\gamma$  or mediate the death of harmful agents by the process of degranulation of granzyme and perforin. It is known that sexual dimorphism plays an important role in the direct involvement of the immune system and NK cells, in addition, the aging process acts to produce physiological differences, resulting in immunological differences. Thus, the objective of this work was to evaluate the expression of immunological markers of surface and intracellular NK cells in males and females. Therefore, peripheral blood from 10 healthy donors was collected, male (n = 5) and female (n = 4), and subsequently evaluated by flow cytometry. The frequency and mean fluorescence intensity variables were analyzed to express the following NK cell markers: NKP44, NKP46, CD94, CD107a, IL-10, INF- $\gamma$ , granzyme and perforin in both sexes. An increase in the population frequency of NK cells was observed, in addition to a higher mean fluorescence intensity of CD107a and production of perforin in males. The expression and production of NKP44, NKP46, CD94, IL-10, INF- $\gamma$  and granzyme was unchanged in both sexes. Thus, it is suggested that under homeostatic conditions, NK cells may present differences in expression and / or fluorescence intensity of constitutive markers and important for their cytotoxic function, such as CD107a and perforin, related to sexual dimorphism. This study is unprecedented because studies that seek to analyze immunological markers and their differences in expression and fluorescence intensity in sexual dimorphism are rare.

Keywords: cytotoxicity, lymphocytes, NK cell receptor

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Características das células CD56 <sup>bright</sup> e CD56 <sup>dim</sup> quanto a função e expressão de receptores. ....	22
<b>Figura 2.</b> Ilustração da expressão de receptores ativadores e inibitórios da membrana da célula NK e seus ligantes na célula alvo. ....	24
<b>Figura 3.</b> Estratégia de análise desenvolvida no software FlowJo. ....	36
<b>Figura 4.</b> Número de células <i>Natural killer</i> – NK circulantes nos grupos masculino e feminino.....	39
<b>Figura 5.</b> Frequência e média de intensidade de fluorescência de células NK expressando CD94 <sup>+</sup> , NKP44 <sup>+</sup> e NKP46 <sup>+</sup> .....	40
<b>Figura 6.</b> Frequência e média de intensidade de fluorescência de células NK na produção das citocinas IL-10 <sup>+</sup> e INF- $\gamma$ <sup>+</sup> .....	41
<b>Figura 7.</b> Frequência e média de intensidade de fluorescência de células NK na produção das citocinas GRANZIMA <sup>+</sup> e PERFORINA <sup>+</sup> . ....	42
<b>Figura 8.</b> Frequência e média de intensidade de fluorescência de células NK na produção de CD107a/LAMP-1 <sup>+</sup> .....	43

## LISTA DE TABELAS E QUADROS

**Tabela 1.** Descrição das idades e média para os indivíduos do sexo masculino .....38

**Tabela 2.** Descrição das idades e média para os indivíduos do sexo feminino .....38

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

**NK** – *Natural killer*

**CD3** - Cluster de diferenciação 3

**CD16** - Cluster de diferenciação 16

**CD56** - Cluster de diferenciação 56

**CD94** - Cluster de diferenciação 94

**ITAM** – Motivo de ativação a base de tirosina

**ITIM** – Motivo de inibição a base de tirosina

**NCR** - receptores de citotoxicidade natural

**INF- $\gamma$**  - Interferon - gama

**TNF- $\alpha$**  – Fator de necrose tumoral - alfa

**GM-CSF** – Fator Estimulador de Colônias de Macrófagos e Granulócitos

**IL-1** – Interleucina 1

**IL-5** – Interleucina 5

**IL-13** – Interleucina 13

**IL-10** – Interleucina 10

**IL-12** – Interleucina 12

**IL-15** – Interleucina 15

**IL-18** – Interleucina 18

**SLT** – Órgão ou tecido linfóide secundário

**ADCC** – Citotoxicidade celular dependente de anticorpo

**MHC** – Complexo principal de histocompatibilidade

**MLL5** - Leucemia de linhagem mista – 5

**TH1** – Células T helper do tipo 1

**TH2** – Células T helper do tipo 2

**TH17** – Células T helper do tipo 17

**LAMP-1** - Proteína ligada a membrana do lisossomo-1

**DCC** - Doenças Cardíacas Coronárias

**DENV** – vírus da Dengue

**CHIKV** – Chikungunya vírus

**CTL** – Controle

**MFI** – Média de intensidade de fluorescência

**Er $\alpha$**  - Receptores para estradiol  $\alpha$

**UFPB** – Universidade Federal da Paraíba

**PB** - Paraíba

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	17
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	20
2.1 Sistema Imunológico e células <i>Natural killer</i> .....	20
2.2 Células <i>Natural killer</i> – NK na saúde e na doença .....	26
2.3 Idade e sexo e sua relação com o sistema imune e as células NK.....	27
3. OBJETIVOS.....	31
3.1 Objetivo geral .....	31
3.2 Objetivos Específicos .....	31
4. MATERIAL E MÉTODOS .....	33
4.1. Considerações éticas .....	33
4.2 Grupo de estudo.....	33
4.3 Critérios de inclusão e exclusão.....	33
4.4 Material Biológico e processamento das amostras .....	33
4.5 Ensaio de imunofluorescência para análise de células NK (CD3 <sup>-</sup> CD16 <sup>+</sup> CD56 <sup>+</sup> ) expressando marcadores de superfície e intracelulares em indivíduos saudáveis ...	34
4.5.1 Lise de hemácias .....	34
4.5.2 Plaqueamento celular.....	34
4.5.3 Marcação de parâmetros extra e intracelulares .....	35
4.6 Anticorpos monoclonais .....	35
4.7 Aquisição e estratégia de análise dos dados de citometria de fluxo .....	35
4.8 Análises estatísticas.....	36
5. RESULTADOS.....	38
5.1 Caracterização etária do grupo de indivíduos avaliados .....	38
5.2 Frequência de células <i>Natural killer</i> – NK nos indivíduos do sexo masculino e feminino.....	39

5.3 Expressão de receptores de membrana celular das células <i>Natural killer</i> – NK em indivíduos dos sexos masculino e feminino.....	39
5.4 Produção das citocinas IL-10 <sup>+</sup> e INF-γ <sup>+</sup> pelas células NK nos sexos masculino e feminino.....	41
5.5 Avaliação do perfil citotóxico das células NK na produção de GRANZIMA <sup>+</sup> , PERFORINA <sup>+</sup> e CD107a/LAMP-1 <sup>+</sup> nos sexos masculino e feminino .....	42
<b>6. DISCUSSÃO .....</b>	<b>45</b>
<b>7. CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>53</b>
REFERÊNCIAS.....	55
ANEXOS .....	63

# INTRODUÇÃO



## 1. INTRODUÇÃO

Estudos referente aos marcadores imunológicos na saúde humana são de suma importância por fornecerem índices de saúde, além de informações para um prognóstico eficaz em relação a diversas patologias que acometem os humanos (AZIZ *et al.*, 2019). As células *Natural killer* (NK) fazem parte da imunidade inata e são classificadas como linfócitos granulares que não apresentam expressão de CD3, mas expressam em suas membranas CD16 e CD56, sendo assim identificados como células NK CD3<sup>-</sup> CD16<sup>+</sup> CD56<sup>+</sup> (ABBAS, LICHTMAN, PILLAI, 2015; PAUL; LAL, 2017).

As células NK compõem aproximadamente cerca de 5-20% das células mononucleares do sangue periférico e possuem aparatos suficientes para reconhecerem e diferenciarem o próprio do não próprio. Por serem dotadas da capacidade de responder a diferentes agentes agressores e nocivos, são células que produzem respostas instantâneas (DAVID KAY; SINKOVICS, 1974; KIESSLING, 1976; ABEL *et al.*, 2018).

Desse modo, o papel das células NK no organismo é composto de 3 atividades principais, sendo elas correspondentes a vigilância antiviral, antibacteriana e antitumoral (BACH; AGUET; SCHREIBER, 1997; DURBIN *et al.*, 1996; KAPLAN *et al.*, 1998).

Para que a atividade destas células seja desenvolvida e elas possam diferenciar e tolerar o próprio é necessário a interação entre receptores que possam ativar ou inibir o comportamento citotóxico. Sendo assim, as células NK expressam receptores com motivos de ativação a base de tirosina (ITAMs), como os receptores de citotoxicidade natural (NCR), exemplos deles são o NKP44 e NKP46. Além dos receptores ativadores, as células NK expressam os receptores inibitórios associados a motivos de inibição a base de tirosina (ITIMs), como exemplo, a formação do heterodímeros CD94/NKG2A (ARNON *et al.*, 2004; ORR *et al.*, 2010; BAYCHELIER *et al.*, 2013; KONJEVIĆ *et al.*, 2017; MOLFETTA *et al.*, 2017).

Quando ativadas ou estimuladas as células NK podem produzir e secretar uma gama de citocinas, que desempenham seus diferentes perfis pró-inflamatório ou regulatório/anti-inflamatório, produzindo INF- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , GM-CSF, IL-5, IL-13 IL-10 (FAURIAT *et al.*, 2010).

Paralelamente, fatores biológicos como idade e envelhecimento possuem a habilidade de produzir mudanças fenotípicas nas células NK, promovendo ou

impedindo a atividade natural das células NK. Os hormônios sexuais resultantes do dimorfismo sexual nos humanos podem levar a diferenças nas taxas de frequências das células NK, isso porque os hormônios sexuais masculinos ou andrógenos e os hormônios sexuais femininos ou estrógenos ligam-se aos receptores existentes nas células, influenciando-as de modo divergente (GAYOSO *et al.*, 2011; ABDULLAH *et al.*, 2012).

Diversos estudos corroboram o fato de que a idade como fator biológico influencia diretamente várias células do sistema imunológico. Mudanças significativas são descritas em pacientes idosos nas células NK em decorrência do processo de envelhecimento, como, por exemplo, alterações da produção de granzima e perforina associadas na citotoxicidade natural da célula (GAYOSO *et al.*, 2011).

Não obstante e tendo em vista a importância deste subtipo celular e seu importante papel como sentinela imunológica no emprego da contenção viral, bacteriana e tumoral, faz-se necessário a elucidação dos mecanismos promotores de variações relacionados com dimorfismo sexual e idade. Ademais, as informações acerca da modulação dos fatores biológicos, como o sexo e idade, são raras e estudos em desenvolvimento devem ser incentivados. Dessa forma, esse estudo objetivou analisar através da técnica de citometria de fluxo um grupo de marcadores imunológicos de respostas e seus mecanismos nas células NK em indivíduos saudáveis de sexos diferentes, em uma determinada faixa-etária em João Pessoa – PB, Brasil, constituindo um trabalho pioneiro e inédito em estudos imunológicos avaliando estes aspectos em seres humanos.

**FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA**

## 2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

### 2.1 Sistema Imunológico e células *Natural killer*

A saúde humana é um componente integral para a progressão do bem-estar durante o decorrer da vida. Nesse contexto, o sistema imunológico é um dos responsáveis por promover a relação entre saúde e bem-estar no que diz respeito ao equilíbrio homeostático.

As mudanças no sistema imunológico ocorrem durante toda a vida, sendo provocadas por diversas condições, sejam elas físicas, fisiológicas, comportamentais, entre outras (KLEIN; FLANAGAN, 2016; AL-ATTAR *et al.*, 2016).

O sistema imunológico ou sistema imune tem sua origem e maturação durante o desenvolvimento da fase uterina até o envelhecimento, através da expressão de genes envolvidos nas respostas imunológicas (SIMON; HOLLANDER; MCMICHAEL, 2015). Do momento do nascimento e durante toda a vida, o sistema imune passa por uma série de constantes desafios com a finalidade de alcançar a maturidade funcional (OLIVEIRA, 2011), de modo que, toda exposição à agentes estranhos tenha como resultado a geração de uma resposta e posteriormente uma memória imunológica.

Um das características proeminentes dos sistemas fisiológicos é a capacidade de produção e transmissão das informações para as diferentes partes do corpo. Assim sendo, o sistema imune é caracterizado por um conjunto de tecidos, órgãos e células que juntos desempenham a função de proteção e retorno a homeostase fisiológica do organismo. Neste âmbito, as reações coordenadas por esse sistema para eliminação dos agentes invasores ao organismo são denominadas de respostas imunológicas (ABBAS, LICHTMAN, PILLAI, 2015; MORIMOTO; NAKAJIMA, 2019).

Nesse contexto, as respostas imunológicas são divididas em duas, imunidade inata e imunidade adaptativa. A imunidade inata refere-se a uma das primeiras linhas de defesa para a contenção e eliminação do agente agressor ao organismo ou de estímulos nocivos (SIMON; HOLLANDER; MCMICHAEL, 2015). Os mecanismos de defesas que constituem a imunidade inata não requerem um contato prévio com os invasores, pois não agem de forma específica no agente agressor, além de serem caracterizados pelo desenvolvimento de mecanismos rápidos de ativação (COSTA, 2015; LIU; CAO, 2016).

A resposta imune inata é composta por um grupo de proteínas e células, com finalidades semelhantes de reconhecimento e destruição do patógeno. As células dendríticas, os neutrófilos, os monócitos/macrófagos e as células *Natural killer* (NK), além de outras células linfoides, compreendem os componentes celulares e, as proteínas sanguíneas, juntamente com os membros do sistema complemento compreendem a porção humoral (ABBAS, LICHTMAN, PILLAI, 2015).

As respostas imunes específicas, também denominadas de resposta imune adaptativa, são geradas por um conjunto de células denominadas linfócitos, sendo os linfócitos B e T as células que regem este tipo de resposta. Além disso, a resposta imune adaptativa aumenta em intensidade e capacidade defensora a cada consecutivo desafio (ABBAS, LICHTMAN, PILLAI, 2015). Ambas as respostas interagem entre si, de modo que o conjunto de células cooperem para a manutenção da homeostasia.

As células NK são um grupo de linfócitos que fazem parte da imunidade inata e corresponde a cerca de 5-20% das células mononucleares no sangue periférico (PBMC) em humanos, são especializadas em reconhecer o próprio do não próprio e por este motivo compõem a primeira linha de defesa contra agressores e moléculas estranhas ao organismo. Essas células não necessitam de uma exposição prévia para produzirem seus mecanismos, sendo ativadas rapidamente quando reconhecem seus alvos (DAVID KAY; SINKOVICS, 1974; KIESSLING, 1976; ABEL *et al.*, 2018). Em condições fisiológicas, as células NK podem estar presente em diversos tecidos como pele, intestino, fígado, articulações, útero, entre outros (PAUL; LAL, 2017) .

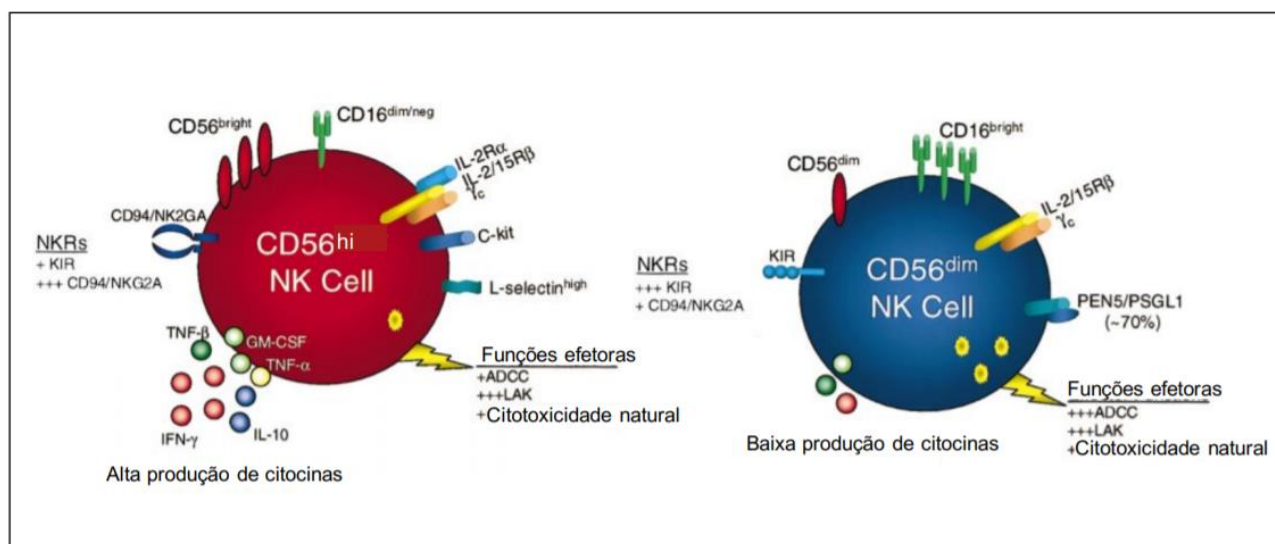
O processo de desenvolvimento e maturação destas células ocorrem tanto nos órgãos linfoides primários, quanto nos órgãos linfoides secundários (SLT) e outros tecidos como fígado e útero. Durante o processo de maturação nos SLT, as células NK sofrem vários estágios de maturação, sendo o quarto estágio definido pela expressão de CD94<sup>+</sup> e o quinto, pela expressão constitutiva de CD16<sup>+</sup>. (EISSENS *et al.*, 2012; SCOVILLE; FREUD; CALIGIURI, 2017).

Em humanos, as células NK podem ser diferenciadas de outros linfócitos pela ausência de expressão de CD3 e pela expressão do CD16 e CD56, ou seja, são linfócitos CD3<sup>-</sup> CD16<sup>+</sup> CD56<sup>+</sup>(PAUL; LAL, 2017).

A molécula de CD16 é expressa na superfície das células NK e tem importante função no processo de ativação, o CD16 é o receptor Fc-γIIIa (fragmento cristalizável – gama) de baixa afinidade para IgG sendo responsável por mediar a

citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC), além disso, foi demonstrado que essa molécula está envolvida no reconhecimento de células neoplásicas (MANDELBOIM et al., 1999; STABILE et al., 2015). O CD56 também conhecido como molécula de adesão as células neurais (NCAM) pode ter sua expressão variante nas células NK, estabelecendo assim dois fenótipos distintos, CD56<sup>bright</sup> e CD56<sup>dim</sup>, a variação ocorrida desta molécula tem a capacidade de gerar diferenças na produção de citocinas em ambas subpopulações. Sabe-se que as células NK CD56<sup>bright</sup> tem a capacidade citotóxica reduzida quando comparada com a subpopulação de NK CD56<sup>dim</sup> (POLI et al., 2009; DE MARIA et al., 2011; STABILE et al., 2015). (Figura 1)

**Figura 1.** Características das células CD56<sup>bright</sup> e CD56<sup>dim</sup> quanto a função e expressão de receptores.



**Fonte:** PATAH, P.A., 2016 adaptado de COOPER et al., 2001. A figura apresenta as duas populações de células NK de acordo com a expressão de CD56. Em vermelho são células NK CD56<sup>bright</sup> também conhecidas como NK CD56<sup>high</sup> com expressão de CD16 reduzida, além da expressão de CD94 e a produção de citocinas. Em azul são as células NK CD56<sup>low</sup> também conhecidas como NK CD56<sup>dim</sup> com elevada expressão de CD16 e do seu perfil citotóxico.

A teoria de que as células NK poderiam ser ativadas através da ausência de auto-marcadores foi um avanço notório da função e da regulação destas células nos processos fisiológicos (KÄRRE et al., 1986), atualmente essa teoria é conhecida como Missing self ou Altered self que consiste na afirmação de que as células NK reconhecem seus alvos através da falta da expressão ou da alteração ocorrida em moléculas de reconhecimento, como por exemplo o MHC-I (HILTON; PARHAM, 2017). A ideia de que as células NK reconhecem especificamente moléculas de auto-

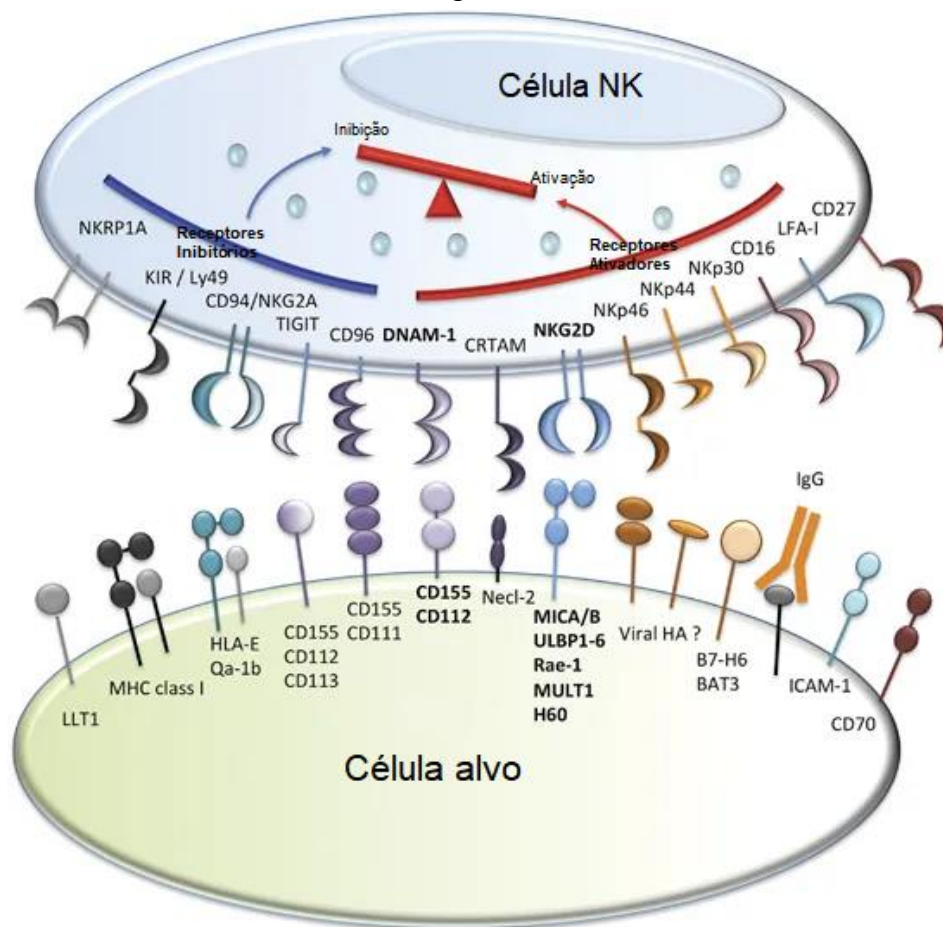
MHC de classe I, levando à inibição de sua atividade aparentava ser radical na época de 1986, no entanto, atualmente, é irrefutável que boa parte das células tumorais diminuem a expressão de moléculas de histocompatibilidade de classe I (MHC-I) na intenção de desviar-se da resposta imunológica mediada por linfócitos T citotóxicos (MORRISON; STEEL; MORRIS, 2018).

Paralelamente, a ativação das células NK pode ocorrer de diversas formas, como supracitado pela ausência de MHC-I, pela resultante gerada através dos receptores ativadores e inibitórios, pela estimulação de citocinas como IL-12, IL-15 e IL-18, a ligação ao CD16 expresso em células NK que desencadeia ADCC (CHAN; SMYTH; MARTINET, 2014; ZWIRNER; ZIBLAT, 2017).

Os receptores ativadores e inibitórios são moléculas expressas nas superfícies das células NK que contém motivos de ativação (ITAMs) ou inibitórios (ITIMs) ligados a tirosina. Dentre a classe dos receptores ativadores estão o NKP44 e o NKP46 pertencentes a classe da família de receptores citotóxicos naturais (NCR). Os ligantes associados a células tumorais e infecções virais para esses receptores são: a proteína nuclear da leucemia de linhagem mista – 5 (MLL5), ligante tumoral para o NKP44; e estruturas virais semelhantes a hemaglutinina e proteoglicanos de heparan sulfato (HSPG) para o NKP46 (Figura 2) (ARNON *et al.*, 2004; BAYCHELIER *et al.*, 2013; KONJEVIĆ *et al.*, 2017).

Os NCR quando ativados exercem o papel de mediador para a produção de citocinas pelas células NK, para isso eles são compostos por um domínio extracelular que interage com o ligante, e um domínio transmembranar que exercem interação com proteínas adaptadoras que são mensageiros secundários atuando na promoção da transdução de sinal até o compartimento citoplasmático-alvo. O NKP44 é a exceção da classe, sendo o único a conter um motivo de inibição a base de tirosina com relatos de funcionalidade apenas para certos ligantes. Para que o sinal ativador seja direcionado para o componente alvo na célula NK é necessário que proteínas adaptadoras façam essa conexão. A associação dos NCR as proteínas adaptadoras CD3 F, FcεR1γ e DAP12 promovem a fosforilação de seus motivos de ativação a base de tirosina que resulta na mobilização de grânulos citotóxicos (KRUSE *et al.*, 2014; KONJEVIĆ *et al.*, 2017).

**Figura 2.** Ilustração da expressão de receptores ativadores e inibitórios da membrana da célula NK e seus ligantes na célula alvo.



**Fonte:** adaptado de CHAN; SMYTH; MARTINET, 2014. A figura apresenta a expressão de receptores ativadores ou inibitórios de células NK e seus ligantes na célula-alvo. Note que é o balaço entre os sinais de inibição e ativação que determinam se a célula NK é ativada ou não.

Os membros da família de receptores *natural killer* do receptor de lectina – 2 (NKG2) formam obrigatoriamente heterodímeros através de pontes dissulfeto com a glicoproteína de membrana CD94, essa interação origina subtipos distintos de receptores com funções ativadores e inibitórias das células NK. O primeiro receptor, CD94/NKG2A é conhecido por conter um motivo de inibição a base de tirosina (ITIM), o que inibe a função das células NK, e os seguintes CD94/NKG2C e CD94/NKG2E não conhece-se motivos de sinalização intracelular, contudo, associa-se com proteínas adaptadoras como a DAP-12 que contém um imunorreceptor com motivo de ativação a base de tirosina, dessa forma, a ativação deste complexo resulta na atividade citotóxica da NK. Estes receptores reconhecem a molécula de HLA-E, molécula de MHC de cadeia alfa não clássica que tem interação com a parte



extracelular do heterodímero CD94/NKG2 (ORR *et al.*, 2010; MOLFETTA *et al.*, 2017). É de suma importância que as células NK expressem receptores inibitórios, justamente para que possam permanecer tolerantes aos tecidos e células próprias.

Alguns dos eventos subsequentes pós inicialização e ativação das células NK são a produção de uma ampla variedade de citocinas como IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , GM-CSF, IL-5, IL-13 e IL-10 (FAURIAT *et al.*, 2010). É com base no perfil de produção de citocinas pelas células NK que é possível diferenciar seus subtipos, semelhante ao perfil de células T (TH1, TH2, TH17), desse modo as células NK podem ser NK1/NK17 secretam IFN- $\gamma$  e IL-17, as NK2 secretam IL-4, IL-5 e IL-13 e NKreg secretam TGF $\beta$  e IL-10 (PERUSSIA, 2001; KATSUMOTO *et al.*, 2004; LANG *et al.*, 2012; LOZA).

O IFN- $\gamma$  produzido pelas células NK desempenha um papel determinante na atividade antitumoral, antiviral e antibacteriana. Sabe-se que esta citocina é produzida via ligação com seu respectivo receptor (IFNGR1) que desencadeia mecanismos celulares dependentes da via de sinalização JAK-STAT (DURBIN *et al.*, 1996; BACH; AGUET; SCHREIBER, 1997; KAPLAN *et al.*, 1998).

Como as células NK são grandes linfócitos granulares, os grânulos contidos no citoplasma produzem uma resposta imune citotóxica através da exocitose de granzima e perforina, denominado processo de degranulação. Para que a degranulação de granzima e perforina aconteça, é necessário que ocorra 4 eventos na célula NK: (1) O encontro da membrana da célula NK com a membrana da célula-alvo e a formação da sinapse imunológica; (2) O arranjo e polarização dos microtúbulos que carregam os lisossomos em direção ao local da sinapse; (3) O reconhecimento e acoplamento do lisossomo com a membrana da célula NK e (4) Ocorre a fusão do lisossomo na membrana da célula NK e liberação de granzima e perforina. Durante esse processo, a proteína ligada a membrana do lisossomo-1 (LAMP-1 ou CD107a) é acoplada a membrana externa, sendo classificada como marcador de degranulação das células NK. A perforina liberada na sinapse imunológica por sua vez promove a formação de poros na membrana da célula-alvo, que facilita a entrada de granzima, uma serina-protease que associada à caspases induz o processo de apoptose na célula-alvo. (ALTER; MALENFANT; ALTFELD, 2004; IDA *et al.*, 2005; TOPHAM; HEWITT, 2009)

## 2.2 Células *Natural killer* – NK na saúde e na doença

Estudos referentes aos marcadores imunológicos na saúde humana, juntamente com alterações ocorridas nas funcionalidades do subconjunto de linfócito são potencialmente promissores para o monitoramento de várias doenças que acometem os humanos (AZIZ *et al.*, 2019).

É inquestionável o papel das células NK como sentinela inata do organismo, pois ela desempenha funções antivirais, antimicrobianas e antitumorais como previamente citado. O papel das células NK na saúde e doença é bastante compreendido, sendo na maioria dos casos o controle ou eliminação do processo patológico. (MANDAL; VISWANATHAN, 2015; LIU; CAO, 2016).

Evidências sugerem que a função das células NK em resposta a inflamações nas vias aéreas é inconclusiva, pois as células NK tanto podem promover a inflamação, quanto inibi-la. A asma é uma doença inflamatória crônica das vias aéreas e a atividade das células NK nesta patologia é elevada, sendo este um fator para promover a inflamação nos pulmões. Foi demonstrado que em pacientes asmáticos, as células NK do sangue periférico previamente iniciadas por estímulo de IL-12, possuem citotoxicidade elevada em comparação ao grupo controle (JIRA *et al.*, 1988).

Em contrapartida, mecanismos apoptóticos desempenhados pelas células NK induzindo a morte de eosinófilos no sangue periférico de pacientes asmáticos graves foram relatados, para isso as células NK foram ativadas através da ligação com a lipoxina A4, que apresenta função de inibir o tráfico de eosinófilos, e sua atividade reduziu significativamente a população de eosinófilos, células que medeiam a hiper-responsividade das vias aéreas na inflamação crônica (BARNIG *et al.*, 2013; SIERRA *et al.*, 2015).

Na artrite reumatoide, uma outra patologia acometida pelo processo inflamatório crônico nas articulações, as células NK CD56<sup>bright</sup> produtoras de altas quantidades de INF- $\gamma$  parecem estar envolvidas com a promoção da inflamação no líquido sinovial (PAZMANY, 2005).

O controle das infecções por arbovírus é inicialmente desempenhado pelas células NK. As arboviroses constituem um sério problema de saúde mundial, pois acomete indivíduos de todas as idades e classes econômicas. A infecção pelo Chikungunya vírus desencadeia uma série de respostas imunológicas, dentre estas foi demonstrado que as células NK aumentam sua frequência e ativação, além da atividade citotóxica

e liberação de perforina na fase aguda após 0 a 3 dias do surgimento dos sintomas. De forma semelhante ocorre na infecção pelo vírus da Dengue, com aumento de frequência e ativação entre 5 a 15 dias da aparição dos sintomas ( THANAPATI; DAS; TRIPATHY, 2015; PETITDEMANGE *et al.*, 2016) .

Na mesma linha de pensamento, estudos comprovaram que as deficiências de frequência ou função das células NK no organismo podem gerar suscetibilidades para infecções virais, em particular para as infecções herpesvirais, por exemplo citomegalovírus, vírus da varicela zoster e vírus Epstein-Barr.(ORANGE, 2013; MACE; ORANGE, 2019).

Sendo assim, é notória a participação das células NK em processos patológicos, sejam estes desenvolvidos pela própria célula ou através do recrutamento de outros tipos celulares.

Ainda assim, as células NK possuem a funcionalidade de vigilância imunológica tumoral. Assim como o sistema imunológico, as células neoplásicas evoluem completamente por meio de mudanças de expressão de receptores, a fim de tornarem-se imperceptíveis para as respostas imunológicas ocasionadas. As células NK podem reconhecer células neoplásicas tanto pela ligação ao MHC-I, quanto pela ligação aos receptores ativadores. Evidências sugerem que as células NK eliminam através da produção de IFN- $\gamma$  sarcomas induzidos por agentes carcinógenos, como o 3-metilcolantreno (3-MCA) (SMYTH, 2008; O'SULLIVAN *et al.*, 2012; MARCUS *et al.*, 2014).

### **2.3 Idade e sexo e sua relação com o sistema imune e as células NK**

O termo dimorfismo sexual é utilizado para descrever quando uma espécie apresenta indivíduos do sexo masculino e do sexo feminino. Atualmente sabe-se que a variável biológica sexo pode interagir com o sistema imunológico, promovendo diferenças significativas na expressão de células, do seu perfil, da sua função entre outras características, além disso, pode diferir entre incidência de doenças do tipo infecciosa ou autoimunes e no surgimento de neoplasias (MÁRQUEZ *et al.*, 2020).

Assim sendo, o dimorfismo sexual atua de modo direto nas células NK, contudo é necessário entender um ponto chave, que são os hormônios sexuais, e mais específico, os esteroides sexuais. Os andrógenos são hormônios produzidos que determinam as características masculinas nos indivíduos, como por exemplo a

testosterona, já os estrógenos são hormônios que determinam as características femininas, por exemplo o estradiol e a progesterona (HIORT, 2013; ZÁRATE; STEVNSNER; GREDILLA, 2017).

De modo geral, indivíduos do sexo feminino possuem sistema imunológico mais reativo quanto comparados aos do sexo masculino, isso se deve ao fato de que os estrógenos possuem um caráter pró-inflamatório, enquanto os andrógenos apresentam caráter anti-inflamatório. Isso leva ao fato de que, se esses hormônios podem modular o perfil das células imunológicas, logo as células imunológicas expressam receptores hormonais capazes de interagir com estas moléculas. De fato, há evidências experimentais que comprovam tal afirmação. Muitas das células do sistema imune expressam receptores para os estrógenos ou andrógenos. (STRAUB *et al.*, 1998; STRAUB, R. H.; CUTOLO, 2001; CUTOLO *et al.*, 2005).

Como os indivíduos do sexo feminino possuem uma resposta imunológica mais robusta em relação aos do sexo masculino, a frequência de doenças autoimunes é maior nas mulheres, sendo este um fato ligado a intensidade na qual a resposta imunológica é produzida. (GLEICHER; BARAD, 2007).

A capacidade que estes hormônios possuem de determinarem diferenças nas frequências de células NK foi evidenciada por ABDULLAH e colaboradores (2012). Nesse trabalho foi analisado o efeito do gênero em subpopulações de linfócitos do sangue periférico e foi observado que as células NK apresentaram uma maior frequência em indivíduos do sexo masculino ao serem comparadas ao sexo feminino.

As mudanças de idade que todos sofremos, assim como o sexo podem modular a funcionalidade e interagir na resposta imunológica. O processo de senescência das células, em que as células NK passam, alteram principalmente seu perfil citotóxico, a capacidade de produção de IFN- $\gamma$ , além da capacidade de responder a estímulos de outras citocinas. Foram demonstrados através de alguns estudos que as populações de células que expressam CD56<sup>bright</sup> + diminuem enquanto as CD56<sup>dim</sup> + são aumentadas em idosos saudáveis, além disso, a expressão de CD57, um marcador com funcionalidade em células NK totalmente diferenciadas é elevado em idosos (GAYOSO *et al.*, 2011).

Os mecanismos de ativação e secreção de citocinas pelas células NK também são alvos de mudanças geradas pelo envelhecimento. ALMEIDA-OLIVEIRA e colaboradores (2011) avaliando crianças e idosos constataram que a produção de

INF- $\gamma$  não é modificada nos idosos, mesmo esses tendo a subpopulação de NK CD56<sup>dim+</sup>, demonstrado que a interferência seja célula específica. A expressão de NKP30 e NKP46 foi diminuída nos idosos, assim como os NKP30 e KIR nas crianças.

Na Doença de Alzheimer (DA) as células NK são reconhecidas como marcadores imunológicos da progressão da doença, isso se dá ao fato de que na DA as células NK estimuladas com IL-2, promovem uma maior liberação de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , que está correlacionada negativamente com a melhora do estado cognitivo quando comparado a idosos acometidos com DA com idosos saudáveis. (PROLO *et al.*, 2007).

Outros estudos buscam identificar como idade articula mudanças no perfil das células NK, e como essas comportam-se frente a células neoplásicas e doenças cardíacas (PAPANIKOLAOU *et al.*, 2004; HAK *et al.*, 2007).

Na perspectiva de células NK como marcadores imunológicos de situações patológicas, um estudo avaliando pacientes portadores de adenocarcinoma colorretal, buscando identificar a correlação entre idade e frequência de células NK detectaram sua diminuição em portadores idosos, demonstrando que para esta patologia existe uma correlação negativa entre frequências de NK e avanço da idade (PAPANIKOLAOU *et al.*, 2004).

O perfil citotóxico das células NK se torna reduzido quando comparado pacientes portadores de doenças cardíacas coronárias (DCC) com média de 63 anos de idade com pacientes saudáveis com média de idade de 64 anos, podendo estar relacionado a diminuição das frequências de células NK CD3<sup>-</sup> CD56<sup>dim+</sup>, como foi afirmado no estudo. Essa tendência de diminuição da atividade citotóxica das células NK é explicada pelo processo de danificação causada pela inflamação crônica (HAK *et al.*, 2007).

Desse modo, há evidências significativas que comprovam a modulação das células NK em diferentes situações patológicas, infecciosas entre outras. Atualmente a existência de estudos que buscam comparar marcadores imunológicos para estas células em indivíduos saudáveis em ambos os sexos é rara. Tendo isso como afirmação, este estudo se torna de suma importância para o entendimento de como as células NK se portam diante do dimorfismo sexual.

# OBJETIVOS

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral

Avaliar os marcadores imunológicos de superfície e intracelular nas células *Natural killer* de indivíduos saudáveis nos sexos masculino e feminino na cidade de João Pessoa-PB, Brasil.

#### 3.2 Objetivos Específicos

- I. Avaliar a frequência populacional de células NK em ambos os sexos;
- II. Avaliar a expressão e média de intensidade de fluorescência dos receptores imunológicos NKP44, NKP46 e CD94 nas células NK comparando em ambos os sexos;
- III. Avaliar a expressão e média de intensidade de fluorescência das citocinas IL-10 e INF- $\gamma$  nas células NK comparando em ambos os sexos;
- IV. Avaliar a expressão e média de intensidade de fluorescência do perfil citotóxico através da expressão de granzima, perforina e CD107a/LAMP-1 nas células NK comparando em ambos os sexos.

# METODOLOGIA



## **4. MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1. Considerações éticas**

Esta pesquisa foi aprovada pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa CONEP (CAAE: 59833416.6.0000.5183), sendo enquadrada no projeto intitulado “Estudos das infecções causadas pelos vírus da Zika, Chikungunya e Dengue” (ANEXO A), e todos os indivíduos que contribuíram para a realização deste estudo foram esclarecidos sobre a importância do trabalho e participaram voluntariamente da pesquisa mediante assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) (ANEXO B).

### **4.2 Grupo de estudo**

Os indivíduos que aceitaram participar voluntariamente deste estudo fizeram parte de 2 grupos distintos: 1) Indivíduos do sexo masculino (n=5), 2) Indivíduos do sexo feminino (n=5). Para todos os indivíduos foram realizadas testagens sorológicas rápidas a fim de identificar infecções prévias por vírus da Dengue (DENV) ou Chikungunya vírus (CHIKV).

### **4.3 Critérios de inclusão e exclusão**

Os critérios de inclusão e exclusão para ambos os grupos foram negatividade para infecções virais, especificamente por DENV ou CHIKV, além disso os indivíduos não poderiam fazer ou estar fazendo uso de medicação contínua.

### **4.4 Material Biológico e processamento das amostras**

Foram coletados amostra de sangue periférico de todos os voluntários por via intravenosa em tubos sem anticoagulante, para obtenção do soro, e em tubos com anticoagulante (Heparina), para obtenção do sangue total. As coletas foram realizadas no Laboratório de Imunologia das Doenças Infecciosas do Centro de Biotecnologia da

Universidade Federal da Paraíba.

Os tubos sem anticoagulante foram inicialmente mantidos em temperatura ambiente para retração do coágulo por no mínimo uma hora, logo após esse tempo os tubos foram submetidos ao processo de centrifugação a 1500 rpm por 5 minutos a temperatura ambiente. Alíquotas do soro foram feitas em câmara de fluxo laminar e subdivididas para conservação em -20°C e outra parte para realização da sorologia para DENV ou CHIKV.

**4.5** Ensaio de imunofluorescência para análise de células NK (CD3<sup>-</sup> CD16<sup>+</sup> CD56<sup>+</sup>) expressando marcadores de superfície e intracelulares em indivíduos saudáveis

#### **4.5.1** Lise de hemácias

Foram coletados aproximadamente 10 mL de sangue periférico em tubos vacutainer contendo heparina de indivíduos saudáveis, sexo masculino (n=5) e sexo feminino (n=4). A primeira etapa do protocolo de citometria é a obtenção dos leucócitos através do procedimento de lise das hemácias e posteriormente a lavagem com tampão fosfato salina (PBS 1x). Logo após as células obtidas passam pelo processo de centrifugação à 2000 rpm por cinco min a 25°C e ressuspenso em seguida.

#### **4.5.2** Plaqueamento celular

Em câmara de fluxo, as células foram plaqueadas em placa de 96 poços onde são adicionados 175 µL meio RPMI suplementado e 25 µL de células, a brefeldina A (substância que impede o transporte de proteínas para o Complexo de Golgi promovendo, assim, seu acúmulo no citoplasma) (1mg/ml) é adicionada aos poços que serão utilizados para marcação intracelular, em seguida a placa é condicionada a um período de incubação em estufa de CO<sub>2</sub> por quatro horas.

#### 4.5.3 Marcação de parâmetros extra e intracelulares

Após o período de quatro horas a placa foi centrifugada e o sobrenadante desprezado, os marcadores de superfície foram adicionados à placa e então incubada a -4°C ao abrigo da luz. A placa foi novamente submetida à centrifugação por 10 minutos (1300 rpm, 4°C), seguida da retirada do sobrenadante e suspensão de células por agitação. Para a fixação das células foi adicionado 100µL de PBS e 100µL de solução de formaldeído 4% em cada poço por 20 minutos a temperatura ambiente. As células aliqüotadas em cada poço foram lavadas por centrifugação sendo adicionado a cada poço 150µL da solução de Permeabilization Buffer (PB), com a finalidade de permeabilizar a membrana plasmática para as marcações intracelulares. Após as marcações intracelulares, a placa foi incubada por 30 minutos à temperatura ambiente, as células foram centrifugadas a 1300 rpm por oito minutos a 4°C e, então, ressuspensas em 200 µL de Wash B e transferidas para tubos de FACS apropriados para leitura no citômetro. Desse modo, as amostras foram submetidas a análise por citometria de fluxo (modelo FACSCANTO II), onde 50.000 eventos foram adquiridos sendo, os dados, analisados no programa FlowJo.

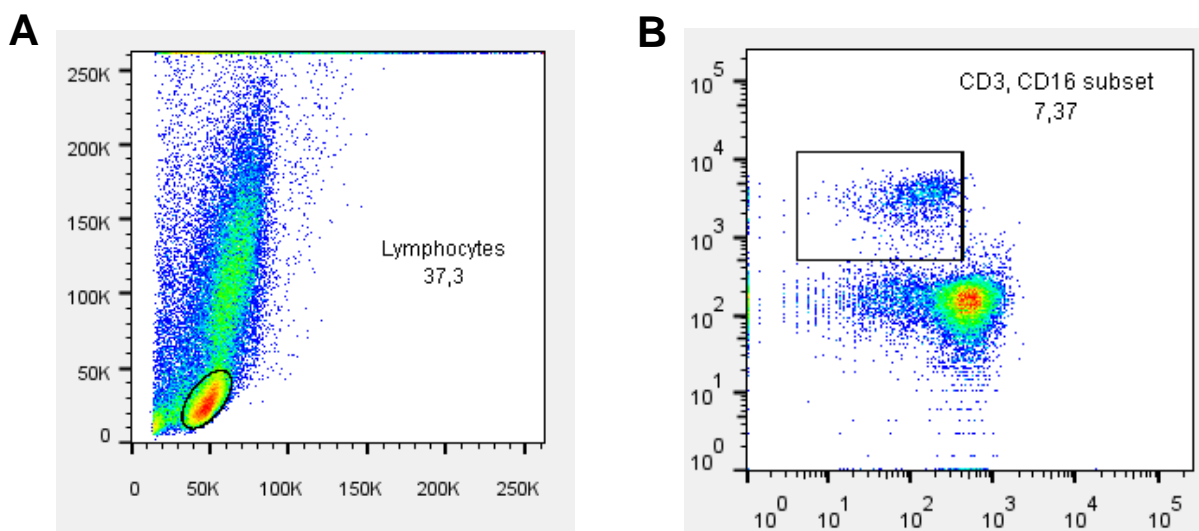
#### 4.6 Anticorpos monoclonais

Os anticorpos monoclonais utilizados nesse estudo foram os controles de Isotipo marcados com (FITC, PE), anti-CD3 (APC), anti-CD56 (PECy5), anti-CD16 (FITC), anti-CD107a (PECy7), anti-granzima (FITC) e anti-perforina, anti-CD94, anti-INF-γ, anti-IL-10, anti-NKP44, anti-NKP46 (PE). Todos os anticorpos utilizados foram adquiridos das companhias BD Pharmingen™ (CA, USA) ou Ebioscience (San Diego, CA, USA).

#### 4.7 Aquisição e estratégia de análise dos dados de citometria de fluxo

Para estratégia de análise foi criado um gate para seleção de linfócitos no gráfico de tamanho e granulosidade, e dentro do gate dos linfócitos as células CD3<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> foram selecionadas. Dentro dessa população, as células foram avaliadas quanto aos marcadores CD107a, GRANZIMA, PERFORINA, CD94, INF-γ, IL-10, NKP44 e NKP46. (Figura 3)

**Figura 3.** Estratégia de análise desenvolvida no software FlowJo.



**Fonte:** Própria. Em (A) ilustração da seleção do gate de linfócitos por tamanho e granulosidade, em (B) ilustração da seleção de células CD3<sup>+</sup> CD16<sup>+</sup> (células NK).

#### 4.8 Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas com auxílio do software Graphpad Prism (Versão 6, Graphpad Software, Inc). Os dados avaliados foram normalizados e para análise comparativa entre os diferentes grupos foram utilizados o teste não paramétrico Mann-Whitney. O intervalo de confiança foi de 95% e os valores foram considerados significativos quando  $p < 0.05$ .

# RESULTADOS

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Caracterização da faixa etária e média de idade dos grupos de indivíduos do sexo masculino e feminino

Um total de 9 indivíduos foram aqui avaliados, sendo 5 indivíduos do sexo masculino e 4 indivíduos do sexo feminino. A média de idade obtida a partir dos indivíduos recrutados no presente estudo são de  $21,75 \pm 2,5$  para indivíduos do sexo feminino e de  $22,6 \pm 3,78$  para indivíduos de sexo masculino, em uma proporção de 0,8:1 (feminino:masculino), conforme demonstrado nas tabelas 1 e 2.

**Tabela 1. Descrição das idades e média de idade para os indivíduos do sexo masculino**

CÓDIGO	IDADE	SEXO
CTL11	27	M
CTL13	22	M
CTL14	26	M
CTL19	19	M
CTL20	19	M
<b>MÉDIA DE IDADE</b>	<b><math>22,6 \pm 3,78</math></b>	

Fonte: Própria. A tabela demonstra a idade dos indivíduos masculinos e a média de idade. M representa o sexo masculino. CTL = CONTROLE.

**Tabela 2. Descrição das idades e média de idade para os indivíduos do sexo feminino**

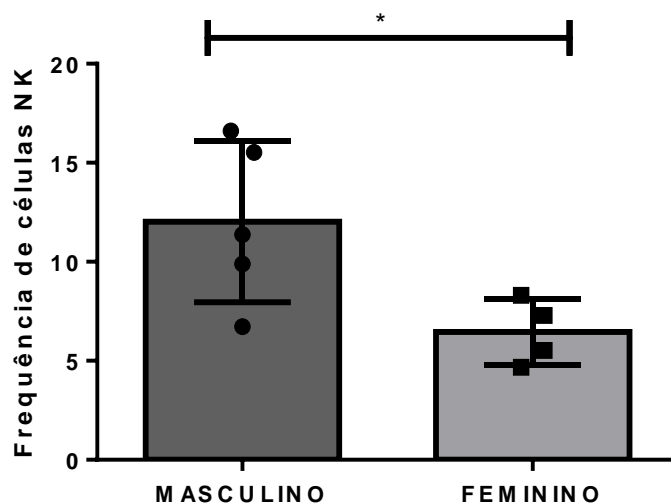
CÓDIGO	IDADE	SEXO
CTL12	25	F
CTL15	21	F
CTL16	19	F
CTL17	22	F
<b>MÉDIA DE IDADE</b>	<b><math>21,75 \pm 2,5</math></b>	

Fonte: Própria. A tabela demonstra a idade dos indivíduos femininos e a média de idade. F representa o sexo feminino. CTL = CONTROLE.

## 5.2. Frequência de células *Natural killer* – NK em indivíduos do sexo masculino e feminino

Inicialmente, a análise comparativa da frequência de células NK nos grupos de indivíduos masculinos e femininos foram realizadas, sendo a maior frequência de células NK circulantes no sangue periférico observada nos indivíduos do sexo masculino em comparação com os indivíduos do sexo feminino (Figura 4).

**Figura 4.** Frequência de células *Natural killer* – NK circulantes nos grupos masculino e feminino



**Fonte:** SILVA, E.D., 2020. Frequência de células NK circulantes no sangue periférico nos grupos de indivíduos masculino e feminino (\*) representa as diferenças estatísticas observadas entre os grupos consideradas significativas quando  $p < 0,05$ . (-) representa diferenças significativas observadas na frequência de células NK entre os grupos avaliados.

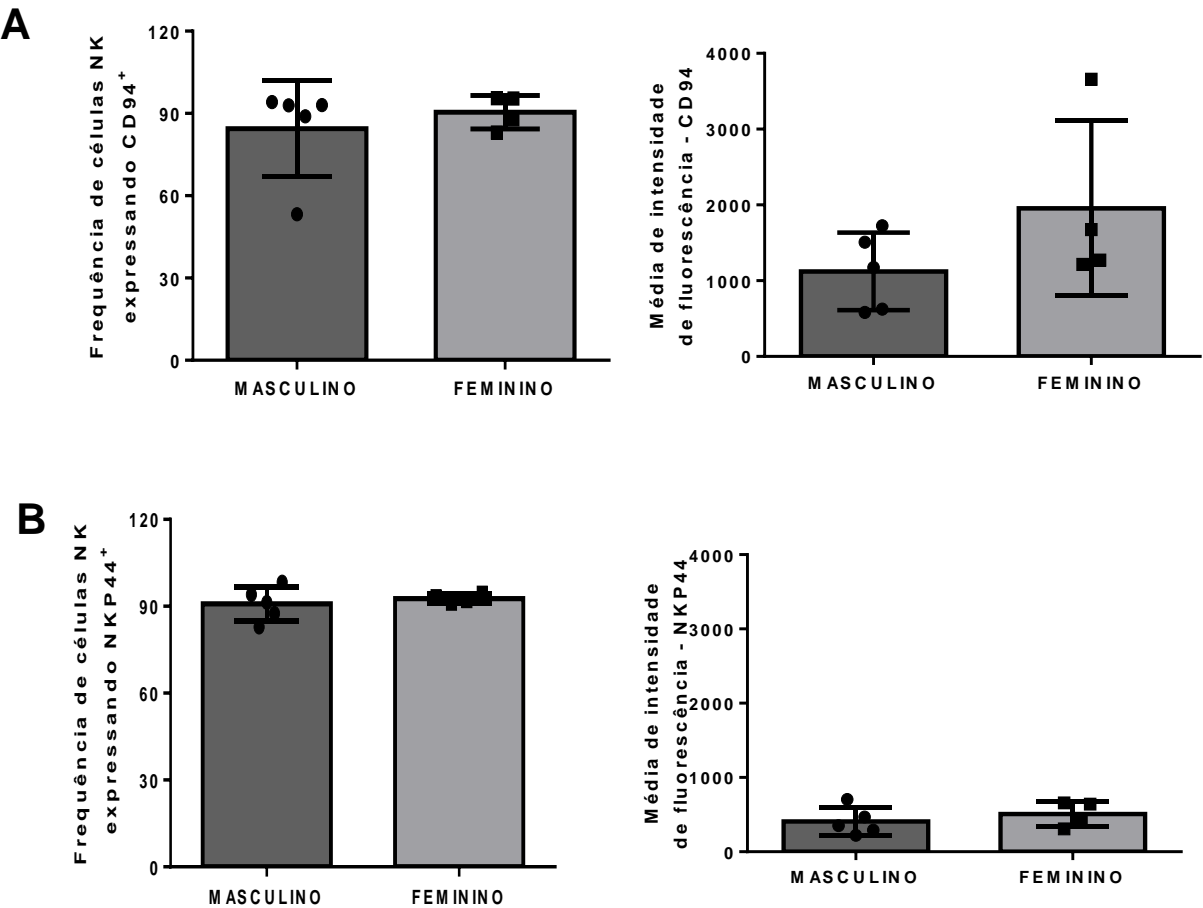
## 5.3. Expressão de receptores de membrana celular das células *Natural killer* – NK em indivíduos dos sexos masculino e feminino

Em seguida, avaliou-se a expressão dos receptores de membrana e receptores de ativação das células NK,  $CD94^+$ ,  $NKP44^+$  e  $NKP46^+$ . Contudo, não foram observadas diferenças estatísticas significativas para nenhum dos marcadores referidos anteriormente (Figura 5).

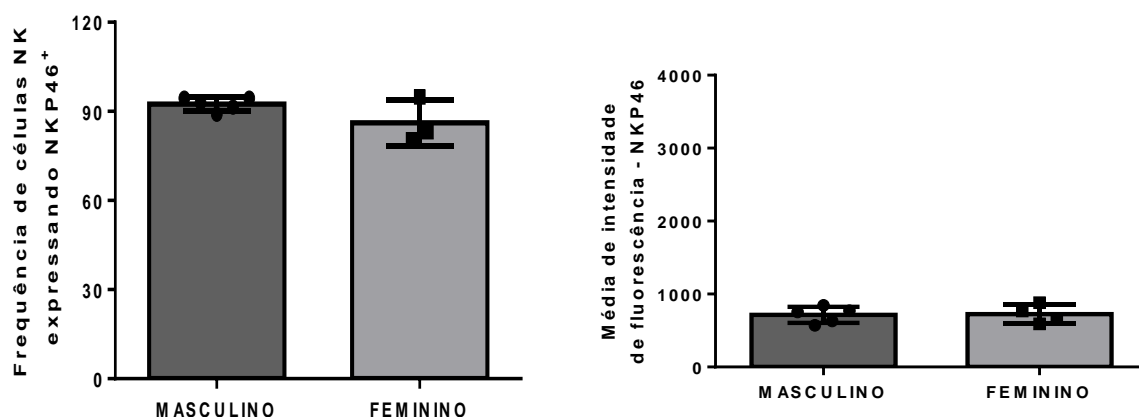
Além disso, calculou-se também a média de intensidade de fluorescência (MFI),

entretanto diferenças estatísticas significativas entre os grupos masculinos e femininos não foram observadas (Figura 5).

**Figura 5. Frequência e média de intensidade de fluorescência de células NK expressando CD94<sup>+</sup>, NKP44<sup>+</sup> e NKP46<sup>+</sup>**





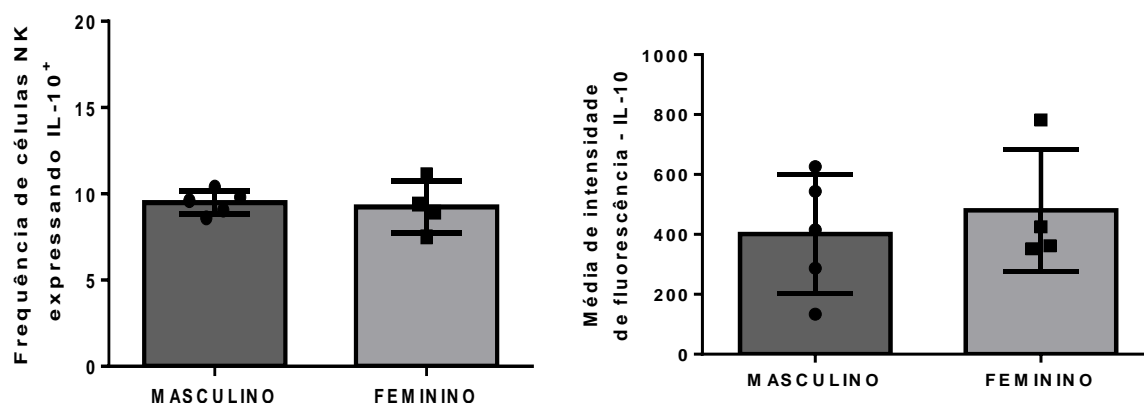
**C**

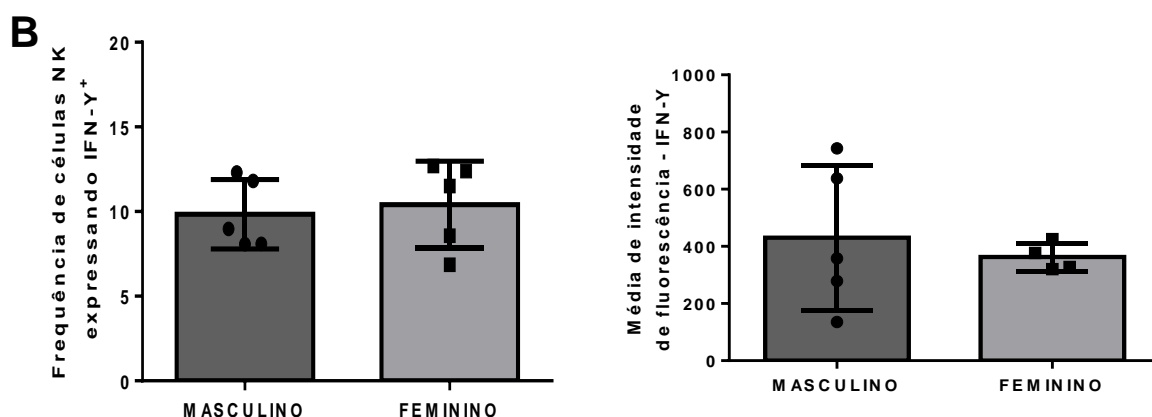
**Fonte:** SILVA, E.D.,2020. Frequência e média de intensidade de fluorescência de células NK circulantes no sangue periférico expressando CD94<sup>+</sup> (A), NKP44<sup>+</sup> (B) e NKP46<sup>+</sup> (C) nos grupos de indivíduos masculino e feminino.

#### 5.4. Produção das citocinas IL-10<sup>+</sup> e IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> pelas células NK em indivíduos do sexo masculino e feminino

A produção de IL-10<sup>+</sup> e IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> pelas células NK também foram avaliadas de modo individual entre os grupos, assim como a média de intensidade de fluorescência, contudo não foram observadas diferenças significativas na produção das citocinas supracitadas (Figura 6).

**Figura 6.** Frequência e média de intensidade de fluorescência de células NK na produção das citocinas IL-10<sup>+</sup> e IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>

**A**



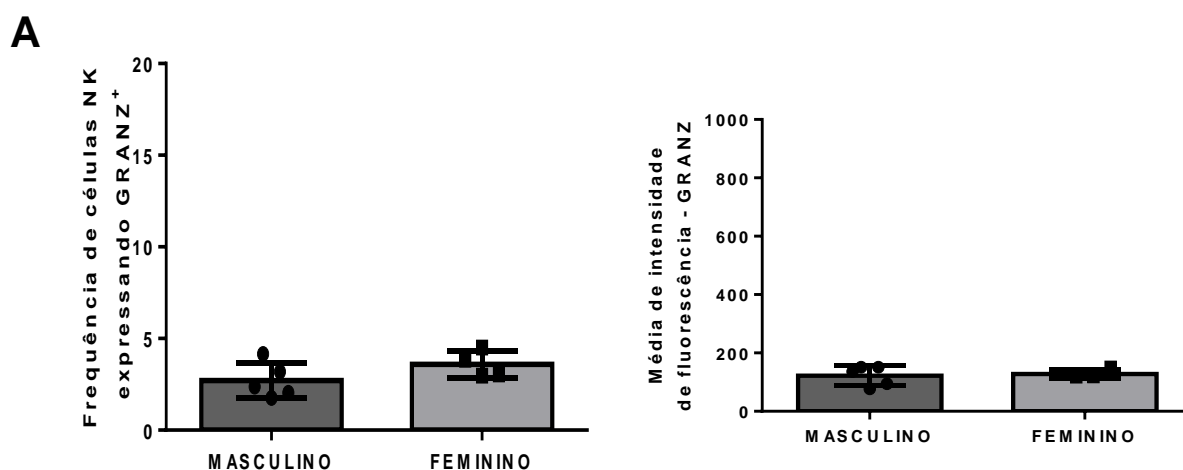
**Fonte:** SILVA, E.S., 2020. Frequência e média de intensidade de fluorescência de células NK na produção das citocinas IL-10<sup>+</sup> (A) e IFN-γ<sup>+</sup> (B) nos grupos de indivíduos masculino e feminino.

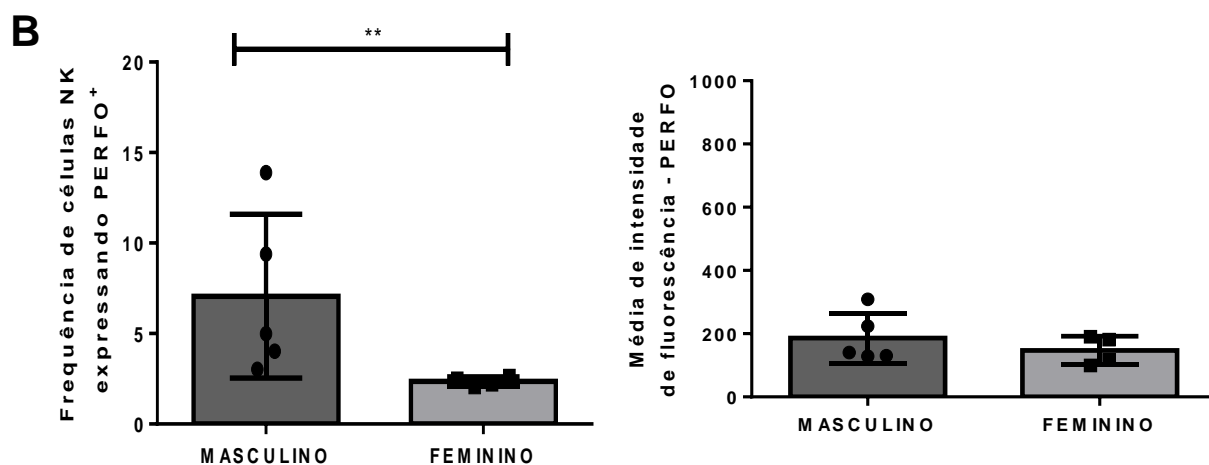
### 5.5. Expressão de GRANZIMA<sup>+</sup>, PERFORINA<sup>+</sup> e CD107a/LAMP-1<sup>+</sup> pelas células NK em indivíduos do sexo masculino e feminino

A avaliação do perfil citotóxico das células NK através da expressão de granzima e perforina foi realizada no presente estudo. Diferenças significativas não foram observadas na expressão e na MFI para a GRANZIMA<sup>+</sup>. Por outro lado, a produção de PERFORINA<sup>+</sup> no sexo masculino se demonstrou elevada de maneira significativa em relação ao grupo de indivíduos do século feminino, embora a média de intensidade de fluorescência não tenha apresentado alterações entre os grupos (Figura 7).

A frequência e a média de intensidade de fluorescência de CD107a/LAMP-1 também foi avaliada. A frequência de CD107a<sup>+</sup> em células NK não apresentou alterações significativas em nenhum dos grupos avaliados, contudo uma redução significativa na MFI foi observada no grupo de indivíduos do sexo feminino em comparação ao do sexo masculino. (Figura 8).

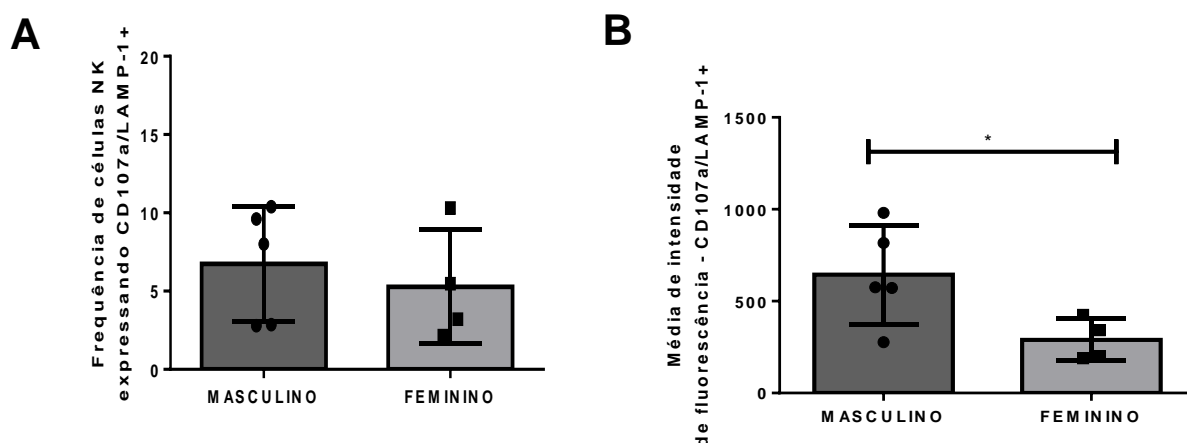
**Figura 7. Frequência e média de intensidade de fluorescência de células NK na produção das citocinas GRANZIMA<sup>+</sup> e PERFORINA<sup>+</sup>**





Fonte: Própria. Frequência e média de intensidade de fluorescência de células NK na produção das citocinas GRANZIMA<sup>+</sup> (A) e PERFORINA<sup>+</sup> (B) nos grupos de indivíduos masculino e feminino (\*) representa as diferenças estatísticas observadas entre os grupos consideradas significativas quando  $p < 0,05$ . (-) representa diferenças significativas observadas na frequência de células NK entre os grupos avaliados.

**Figura 8. Frequência e média de intensidade de fluorescência de células NK na produção de CD107a/LAMP-1<sup>+</sup>**



**Fonte:** SILVA, E.D., 2020. Frequência e média de intensidade de fluorescência de células NK na produção de CD107a/LAMP-1<sup>+</sup> nos grupos de indivíduos do sexo masculino e feminino. Em (A) a frequência de células NK CD107a/LAMP-1<sup>+</sup> e em (B) a média de intensidade de fluorescência para CD107a/LAMP-1<sup>+</sup> (\*) representa as diferenças estatísticas observadas entre os grupos consideradas significativas quando  $p < 0,05$ . (-) representa diferenças significativas observadas na frequência de células NK entre os grupos avaliados

**DISCUSSÃO**

## 6. DISCUSSÃO

Indivíduos dos sexos masculino e feminino possuem o repertório celular e do sistema imune semelhantes, diferindo apenas na frequência celular, intensidade e magnitude de suas respostas a distintos agentes nocivos. A distinção entre as respostas imunes reflete o panorama das interações endócrino-imunes geridas pelo dimorfismo sexual (KLEIN, 2012).

Existem várias diferenças relacionadas ao dimorfismo sexual em respostas imunes mediada pela imunidade inata, como por exemplo, a atividade e proliferação das células apresentadoras de antígenos (APCs). Estudos comprovam que a frequência assim como a atividade dos monócitos, macrófagos e células dendríticas (DC) são maiores no sexo feminino quando comparado ao sexo masculino. Em linhas gerais, as respostas imunes possuem maior intensidade em indivíduos do sexo feminino quando comparado a indivíduos do sexo masculino. Entretanto, as células NK em específico apresentam maior atividade no sexo masculino (KLEIN, 2012; KLEIN; FLANAGAN, 2016; RUGGIERI *et al.*, 2016).

Aqui foram analisadas as diferenças nas frequências das células NK nos sexos masculinos e femininos, na qual houve maior frequência nos homens em relação as mulheres. Diferenças semelhantes na população de células NK foram descritas anteriormente ao analisar linfócitos T, linfócitos B e células NK, em indivíduos saudáveis do sexo masculino e feminino (ABDULLAH *et al.*, 2012). Este é o primeiro estudo que analisa e compara a frequência populacional de células NK que expressam marcadores extracelulares e intracelulares em indivíduos do sexo masculino e feminino, caracterizando um trabalho pioneiro nos estudos imunológicos.

A disparidade de frequência populacional de subtipos de linfócitos ocasionada pelo dimorfismo sexual, em especial nas células NK, pode resultar em uma maior suscetibilidade para infecções oportunistas, desenvolvimento de neoplasias, além do surgimento de doenças autoimunes e sua progressão para patogênese (ABDULLAH *et al.*, 2012). Além disso, alguns estudos demonstraram que os fatores genéticos e epigenéticos, somados aos hormônios sexuais, são variáveis que interferem diretamente nos componentes da resposta imunológica (FISH, 2008; LIBERT; DEJAGER; PINHEIRO, 2010; MARKLE; FISH, 2014; FISCHER *et al.*, 2015).

Dentre as células do sistema imunológico inato estão as células NK, as quais podem expressar receptores hormonais para os hormônios sexuais, denotando que

estas moléculas possuem uma atividade reguladora da função destas células. Um dos receptores expressos nas células NK são os receptores para estradiol  $\alpha$  (ER $\alpha$ ). O estradiol, por sua vez, se caracteriza como um hormônio encontrado em níveis elevados em pessoas do sexo feminino e possuem a capacidade de ligação ao seu receptor hormonal promovendo a diminuição da atividade citotóxica das células NK no sexo feminino (LIBERT; DEJAGER; PINHEIRO, 2010; FISCHER *et al.*, 2015).

Após avaliar a frequência das células NK em indivíduos saudáveis e visando compreender os mecanismos dos marcadores imunológicos aqui estudados, buscou-se investigar a dinâmica entre os receptores ativadores NKP44 e NKP46 e a molécula CD94 que forma heterodímeros com a família NKG2 das células NK no organismo saudável, contudo diferenças na expressão para tais marcadores imunológicos não foram obtidas, sugerindo que a expressão destas moléculas não diferem entre os sexos masculino e feminino.

Os receptores NKP44 e NKP46 são expressos nas células NK, sendo o NKP46 expresso de forma constitutiva. O NKP44 é expresso majoritariamente nas células NK ativadas por IL-2, IL-15 ou IL-1 $\beta$  e o NKP46 tanto em células NK ativadas como em repouso (VITALE *et al.*, 1998; MATTIOLA *et al.*, 2015; SHEMESH *et al.*, 2016; BARROW; MARTIN; COLONNA, 2019). Analisando a expressão de NKP46 com as variáveis etnia e gênero foi observado que a maior frequência de expressão estava associada a pessoas do sexo feminino e de raça caucasiana. Ademais, a expressão deste marcador pode estar condicionada a outros fatores que não foram aqui estudados (GOLDEN-MASON *et al.*, 2012). É possível que a elevada ou a redução da expressão destes receptores estejam associadas a condições patológicas, como discutido a seguir.

Em situações patológicas, a expressão do NKP44 e NKP46 tanto podem ser reduzidas (THANAPATI; GANU; TRIPATHY, 2017) como podem ser elevadas (THANAPATI; DAS; TRIPATHY, 2015) no sangue periférico. Esse quadro de variação na expressão dos receptores de ativação de células NK é visualizado na infecção pelo Chikungunya vírus durante a fase crônica da doença para células NK NKP46<sup>+</sup> e na fase crônica e recuperada para células NK NKP44<sup>+</sup>. Embora o sexo não tenha sido uma variável estudada, os participantes da pesquisa eram de ambos os sexos, tanto para o grupo controle, quanto para os grupos crônicos e recuperados (THANAPATI; GANU; TRIPATHY, 2017). Dessa forma, pode-se sugerir que as diferenças na produção de receptores de ativação nas células NK estejam relacionadas tanto com

a intensidade de resposta destas células, pois na fase aguda a carga viral encontra-se alta em relação a fase crônica, como pelo tipo de desafio que estão sendo expostas.

De acordo com Freud e colaboradores, no ano de 2006, células NK adquirem expressão para o receptor CD94 durante a 4ª fase de desenvolvimento nos órgãos linfóides secundários, sendo este fenótipo coincidentemente alcançado paralelamente com a capacidade de secreção de INF- $\gamma$ . Não foram observadas diferenças significativas para a diferença de expressão deste receptor entre os sexos masculinos e femininos.

Estudos transversais demonstraram que quando comparados pacientes portadores de HIV/AIDS e pacientes com HIV e câncer, com média de idade de 43 – 46 anos não havia resultados significativos em relação ao grupo controle, tendo como possibilidade que a infecção crônica pela HIV pode não modular o perfil de expressão das células NK CD94<sup>+</sup> (JUNIOR *et al.*, 2017). Os resultados encontrados foram semelhantes aos evidenciados aqui em condições saudáveis, o que provavelmente tem relação com a expressão deste receptor associada com outros fatores, como por exemplo, microambiente e a exposição de citocinas como IL-12 ou IL-15 (TANAKA *et al.*, 2004).

As células NK são capacitadas para produzir e secretar diferentes níveis das citocinas IL-10 e IFN- $\gamma$  para regulação de processos inflamatórios e das respostas imunes (CLARK *et al.*, 2016). Não foram observadas diferenças na expressão de ambas as citocinas entre os sexos masculino e feminino neste estudo. A IL-10 é uma citocina cuja função está associada à proteção do organismo a respostas inflamatórias exacerbadas e da mesma forma prevenindo patologias autoimunes (SARAIVA; O'GARRA, 2010). Estudos relatam a influência de atividade física e a participação da IL-10 produzida por células NK em processos fisiológicos de homens idosos saudáveis (JANKORD; JEMIOLO, 2004; ANJOS *et al.*, 2016). Logo, um dos fatores que possam estar associados a produção de diferentes níveis significativos de IL-10 são estímulos pró-inflamatórios.

Nos trabalhos realizados por Jankord e Jemiolo (2004), utilizando a participação de 16 idosos do sexo masculino com idade entre 65 – 75 anos e que desenvolviam altos ou baixos níveis de atividades físicas, foram vistas diferenças significativas utilizando a técnica de ELISA na produção de IL-10, comparado ao grupo que tinha alta prática de exercícios físicos com os de pouca prática de exercícios

físicos. Além disso, também analisaram a produção de IL-6 nos mesmos participantes e constataram que quanto maior a produção de IL-10, menor foi a produção de IL-6 em participantes que desenvolviam alta prática de exercícios. Em contraste, participantes que desenvolviam pouca prática de exercícios físicos apresentaram níveis aumentados de IL-6 e baixos de IL-10, evidenciando, dessa forma, um mecanismo compensatório entre mecanismos pró e anti-inflamatório dependente da intensidade do exercício físico desenvolvido. Resultados semelhantes foram encontrados em Windsor e colaboradores (2018). Mesmo na saúde, variações na produção de citocinas requerem algum estímulo. O exercício físico é um fator estimulante para a produção de citocinas pró ou anti-inflamatória, a depender da intensidade do exercício, sendo assim, em estado homeostático os níveis de produção de citocina IL-10 podem ser mantidos no equilíbrio em ambos os sexos até serem ativadas por algum processo ou estímulo (JANKORD E JEMIOLO, 2004).

As células NK contribuem de forma significativa para impedir a promoção da infecção viral e o desenvolvimento de células neoplásicas através da produção de IFN- $\gamma$ . O IFN- $\gamma$  apresenta como função principal a promoção das funções fagocíticas dos macrófagos, a síntese de citocinas de caráter pró-inflamatório e produtos antimicrobianos, além da síntese de MHC de classe I e II auxiliando na apresentação de antígeno (ABBAS, LICHTMAN, PILLAI, 2015). Estudos prévios comparando a produção de IFN- $\gamma$  em condições saudáveis em sexos opostos são escassos.

Em circunstâncias patológicas a produção de IFN- $\gamma$  por células NK pode ser reduzida em pacientes portadores de câncer gástrico. Esse estudo analisou 261 participantes recém-diagnosticados para o câncer gástrico, no qual 161 eram do sexo masculino e 100 do sexo feminino, com média de idade sendo 60,5 anos. Os pacientes em comparação com o grupo controle demonstraram níveis inferiores de produção de IFN- $\gamma$ . Não foi analisado a diferença entre os sexos. No entanto, atribui a redução significativa dos níveis de IFN- $\gamma$  aos estágios mais avançados do câncer gástrico (LEE *et al.*, 2017).

Processos fisiológicos decorrentes do envelhecimento também podem alterar de forma significativa a produção de IFN- $\gamma$  pelas células NK em infecções crônicas. Diante disso, Speziali e colaboradores (2004) analisaram o perfil de expressão de células NK que produzem IFN- $\gamma$  em indivíduos de zona endêmica para esquistossomose. Participaram desse estudo pessoas de ambos os sexos com idades entre 10 – 95 anos. Embora não tenham avaliado diferenças de produção de IFN- $\gamma$



entre os sexos, o estudo objetivou estudar o perfil das células NK produtoras de IFN- $\gamma$  em diferentes intensidades de infecção pelo *Schistosoma mansoni* durante o processo de envelhecimento. Foram encontrados resultados demonstrando que as células NK IFN- $\gamma^+$  tem uma menor expressão apenas em indivíduos positivos e pós-estimulados para o *S. mansoni* após os 70 anos de idade, quando comparado com o grupo negativo para a infecção referida anteriormente. Esses dados sugerem que a produção de IFN- $\gamma^+$  pelas células NK podem ser moduladas pelo processo de envelhecimento quando expostas a infecção crônica.

As células NK possuem como componentes de combate a infecções e células neoplásicas, a liberação de granzima e perforina. Buscou-se avaliar o perfil citotóxico e de degranulação das células NK quanto a liberação de Granzima B, Perforina e a expressão do CD107a/LAMP-1 entre indivíduos do sexo masculino e feminino. Contudo, não obtivemos diferenças estatísticas para a expressão de Granzima.

Atualmente, pouco se conhece sobre como o dimorfismo sexual pode modular a atividade citotóxica das células NK em condições saudáveis. É conhecido que níveis elevados de granzima estão associados à doenças inflamatórias, como a artrite reumatoide (RONDAY *et al.*, 2001; GOLDBACH-MANSKY *et al.*, 2005). Em uma outra situação patológica, os níveis de granzima B são reduzidos, como visto em pacientes HIV positivos tratados com a terapia antirretroviral (NABATANZI *et al.*, 2019). Nenhuma das literaturas supracitadas analisa a diferença entre os sexos na expressão de granzima pelas células NK, entretanto evidenciam como a produção de granzima pode ser alterada dependente de qual desafio as células NK são expostas.

A avaliação da produção de perforina apresentou resultados significativos, com um aumento na produção em indivíduos do sexo masculino. Os níveis de perforina secretados pelas células NK frente a um organismo saudável podem ser articulados de acordo com as necessidades fisiológicas, isso porque os processos de morte celular mediada pela produção de perforina das células NK ocorrem naturalmente, por outro lado, a diminuição exacerbada pode induzir processo patológico, como no caso da Linfo-histiocitose hemofagocítica familiar tipo dois (FHL-2), demonstrando o duplo papel da perforina na proteção ou promoção de patologias (WILLENBRING; JOHNSON, 2017).

Recentes pesquisas avaliando o PBMC de homens e mulheres saudáveis e a relação com o envelhecimento analisaram as células CD56<sup>+</sup> NK de 172 participantes com idade entre 22 a 93 anos. Foram vistas diferenças significativas na correlação

entre aumento da idade e aumento da atividade citotóxica das células NK e consequente aumento nos níveis de produção de granzima e perforina em ambos os sexos (MÁRQUEZ *et al.*, 2020), dessa maneira, a variação da produção de granzima e perforina entre os sexos aumenta substancialmente com a idade.

Durante o processo de envelhecimento, alterações epigenômicas podem diferir entre os sexos, sendo estas capazes de modular o sistema imunológico. O envelhecimento como processo fisiológico é uma variável importante no sistema imunológico, sendo um dos processos que afeta a perda rápida de acessibilidade a cromatina. Análises mostraram que PBMC passam por abruptas mudanças epigenômicas em dois períodos distintos durante a vida adulta e diferem entre os sexos, sendo a primeira entre as idades de 38 a 41 anos em mulheres e de 40 a 42 anos em homens. A segunda mudança ocorre entre 66 a 71 anos nas mulheres e 62 a 64 anos nos homens com uma magnitude aumentada no sexo masculino (MÁRQUEZ *et al.*, 2020).

O processo de degranulação da célula NK associada a expressão de CD107a/LAMP-1 demonstrou resultados significativos para a média de intensidade de fluorescência, sendo maior no sexo masculino e menor no sexo feminino. Resultados aparentes foram encontrados quando analisaram a expressão de CD107a pelas células NK pós-estimuladas em pessoas saudáveis, corroborando que as células NK aumentam acentuadamente os níveis de degranulação quando ativadas. Ademais, o perfil citotóxico dessas células foi avaliado frente a expressão e produção de CD107a/LAMP-1, INF- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , e foi visto que a maior parte das células NK pós-estimuladas expressavam apenas o CD107a (66% NK CD107a<sup>+</sup>). Isso mostra que o CD107a representa um marcador de expressão notória da atividade citotóxica das células NK (ALTER; MALENFANT; ALTFELD, 2004; AKTAS *et al.*, 2009). Além disso, os resultados do MFI apontam que embora não haja diferença de expressão do marcador em questão, existe diferença na proporção da intensidade de produção entre as células NK CD107a<sup>+</sup> do sexo masculino e do sexo feminino, sugerindo uma capacidade intrínseca elevada de degranulação nos indivíduos do sexo masculino.

Dessa forma, a existência de diferenças celulares no dimorfismo sexual como demonstrado anteriormente, sugere que o sexo possui a funcionalidade de modular características imunes. Nas células NK essa variação é refletida na frequência celular e em algumas moléculas do perfil citotóxico destas células na faixa etária compreendida entre 20 – 23 anos. A aplicabilidade destes resultados podem ser

visualizadas quando comparada as diversas situações patológicas como forma de promover o entendimento do processo patológico, além disso, esses dados fornecem as características homeostáticas destas células tendo como finalidade cooperar com outros dados pré-existentes e com estudos que serão desenvolvidos, dessa maneira a elucidação da interação entre o sistema endócrino-imune é satisfatória para fornecer índices de saúde entre o dimorfismo sexual.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

## **7. CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Estudos como este são escassos, porém, apresentam alta relevância, pois fornecem informações de como os hormônios sexuais podem interagir com as células e modular seu perfil, além de evidenciar como o sistema endócrino está em direta relação com o sistema imune, assim fornecendo indicadores de saúde. Pela primeira vez as células NKs são estudadas em indivíduos saudáveis e comparadas entre diferença de sexo para os marcadores de citotoxicidade, receptores de ativação e produção de citocina pró e anti-inflamatória.

Como foi evidenciado anteriormente, a variável biológica sexo é um componente importante na diferença de mecanismos celulares promovidos pelas células NK na saúde, e como foi visto, há diferenças significativas nas porcentagens e perfil citotóxico destas células no dimorfismo sexual. Sendo assim, é possível sugerir que o dimorfismo sexual modula de forma direta a frequência e alguns dos componentes do perfil citotóxico das células NK.

## REFERÊNCIAS

## REFERÊNCIAS

- ABBAS, ABUL K.; LICHTMAN, ANDREW H.; PILLAI, SHIV. **Imunologia celular e molecular**. 8. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2015.
- ABDULLAH, M. et al. Gender effect on in vitro lymphocyte subset levels of healthy individuals. **Cellular Immunology**, v. 272, n. 2, p. 214–219, 2012.
- ABEL, A. M. et al. Natural killer cells: Development, maturation, and clinical utilization. **Frontiers in Immunology**, v. 9, n. AUG, p. 1–23, 2018.
- AKTAS, E. et al. Relationship between CD107a expression and cytotoxic activity. **Cellular Immunology**, v. 254, n. 2, p. 149–154, 2009.
- AL-ATTAR, A. et al. The effect of sex on immune cells in healthy aging: Elderly women have more robust natural killer lymphocytes than do elderly men. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 156, p. 25–33, 2016.
- ALMEIDA-OLIVEIRA, A. et al. Age-related changes in natural killer cell receptors from childhood through old age. **Human Immunology**, v. 72, n. 4, p. 319–329, 2011.
- ALTER, G.; MALENFANT, J. M.; ALTFELD, M. CD107a as a functional marker for the identification of natural killer cell activity. **Journal of Immunological Methods**, v. 294, n. 1–2, p. 15–22, 2004.
- ANJOS, M. C. G. DOS et al. The effects of brief physical conditioning on immune cells and cytokines in elderly individuals in Manaus, Amazonas. **Fisioterapia em Movimento**, v. 29, n. 2, p. 305–315, 2016.
- ARNON, T. I. et al. The mechanisms controlling the recognition of tumor- and virus-infected cells by NKp46. **Blood**, v. 103, n. 2, p. 664–672, 2004.
- AZIZ, N. et al. Biological variation of immunological blood biomarkers in healthy individuals and quality goals for biomarker tests. **BMC Immunology**, v. 20, n. 1, p. 1–11, 2019.
- BACH, E. A.; AGUET, M.; SCHREIBER, R. D. THE IFN $\gamma$  RECEPTOR: A Paradigm for Cytokine Receptor Signaling. **Annual Review of Immunology**, v. 15, n. 1, p. 563–591, 1997.
- BARNIG, C. et al. Eosinophilic inflammation in allergic asthma. **Frontiers in Pharmacology**, v. 4 APR, n. April, p. 1–9, 2013.
- BARROW, A. D.; MARTIN, C. J.; COLONNA, M. The natural cytotoxicity receptors in health and disease. **Frontiers in Immunology**, v. 10, n. MAY, p. 1–20, 2019.
- BAYCHELIER, F. et al. Identification of a cellular ligand for the natural cytotoxicity

receptor NKp44. **Blood**, v. 122, n. 17, p. 2935–2942, 2013.

CHAN, C. J.; SMYTH, M. J.; MARTINET, L. Molecular mechanisms of natural killer cell activation in response to cellular stress. **Cell Death and Differentiation**, v. 21, n. 1, p. 5–14, 2014.

CLARK, S. E. et al. Bacterial Manipulation of NK Cell Regulatory Activity Increases Susceptibility to *Listeria monocytogenes* Infection. **PLoS Pathogens**, v. 12, n. 6, p. 1–21, 2016.

COOPER, M. A. et al. Human natural killer cells: A unique innate immunoregulatory role for the CD56BRIGHT SUBSET. **Blood**, v. 96, n. 11 PART II, p. 3146–3151, 2001.

COSTA, V. R. D. M.; ORTEGA, J. M. Estudo da ancestralidade de genes componentes do sistema imune. p. 134, 2015.

CUTOLO, M. et al. Sex hormone modulation of cell growth and apoptosis of the human monocytic/macrophage cell line. **Arthritis research & therapy**, v. 7, n. 5, p. 1124–1132, 2005.

DAVID KAY, H.; SINKOVICS, J. G. Cytotoxic Lymphocytes From Normal Donors. **The Lancet**, v. 304, n. 7875, p. 296–297, 1974.

DE MARIA, A. et al. Revisiting human natural killer cell subset function revealed cytolytic CD56dimCD16+ NK cells as rapid producers of abundant IFN- $\gamma$  on activation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 108, n. 2, p. 728–732, 2011.

DURBIN, J. E. et al. Targeted disruption of the mouse Stat1 gene results in compromised innate immunity to viral disease. **Cell**, v. 84, n. 3, p. 443–450, 1996.

EISSENS, D. N. et al. Defining early human NK cell developmental stages in primary and secondary lymphoid tissues. **PLoS ONE**, v. 7, n. 2, 2012.

FAURIAT, C., LONG, E. O., LJUNGGREN, H. G., BRYCESON, Y.T. Regulation of human NK-cell cytokine and chemokine production by target cell recognition. **Blood** 115(11):2167–76. 2010.

FISCHER, J. et al. Sex differences in immune responses to infectious diseases. **Infection**, v. 43, n. 4, p. 399–403, 2015.

FISH, E. N. The X-files in immunity: sex-based differences predispose immune responses. **Nature Reviews Immunology**, v. 8, n. SEPTEMBER, p. 737–744, 2008.

FREUD, A. G. et al. Evidence for discrete stages of human natural killer cell differentiation in vivo. **Journal of Experimental Medicine**, v. 203, n. 4, p. 1033–1043, 2006.

GAYOSO, I. et al. Immunosenescence of human natural killer cells. **Journal of**



**Innate Immunity**, v. 3, n. 4, p. 337–343, 2011.

GLEICHER, N.; BARAD, D. H. Gender as risk factor for autoimmune diseases. **Journal of Autoimmunity**, v. 28, n. 1, p. 1–6, 2007.

GOLDBACH-MANSKY, R. et al. Raised granzyme B levels are associated with erosions in patients with early rheumatoid factor positive rheumatoid arthritis. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 64, n. 5, p. 715–721, 2005.

GOLDEN-MASON, L. et al. Race- and gender-related variation in NKp46 expression associated with differential anti-HCV immunity. **Hepatology**, v. 23, n. 1, p. 1214–1222, 2012.

HAK, Ł. et al. NK cell compartment in patients with coronary heart disease. **Immunity and Ageing**, v. 4, p. 1–8, 2007.

HILTON, H. G.; PARHAM, P. Missing or altered self: human NK cell receptors that recognize HLA-C. **Immunogenetics**, v. 176, n. 1, p. 139–148, 2017.

HIORT, O. The differential role of androgens in early human sex development. **BMC Medicine**, v. 11, n. 1, 2013.

IDA, H. et al. Granzyme B and natural killer (NK) cell death. **Modern Rheumatology**, v. 15, n. 5, p. 315–322, 2005.

JANKORD, R.; JEMIOLO, B. Influence of physical activity on serum IL-6 and IL-10 levels in healthy older men. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 36, n. 6, p. 960–964, 2004.

JIRA, M. et al. Natural killer and interleukin-2 induced cytotoxicity in asthmatics: I. Effect of acute antigen-specific challenge. **Allergy**, v. 43, n. 4, p. 294–298, 1988.

JUNIOR, O. N. T. et al. Global Perspectives on Medical Sciences patients with HIV / AIDS and cancer. v. 01, 2017.

KAPLAN, D. H. et al. Demonstration of an interferon  $\gamma$ -dependent tumor surveillance system in immunocompetent mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 95, n. 13, p. 7556–7561, 1998.

KÄRRE, K. et al. Selective rejection of H-2-deficient lymphoma variants suggests alternative immune defence strategy. **Nature**, v. 319, n. 6055, p. 675–678, 1986.

KATSUMOTO, T. et al. STAT6-Dependent Differentiation and Production of IL-5 and IL-13 in Murine NK2 Cells. **The Journal of Immunology**, v. 173, n. 8, p. 4967–4975, 2004.

KIESSLING, R. Natural Killer Cells in the Mouse. **The Role of Products of the Histocompatibility Gene Complex in Immune Responses**, p. 77–85, 1976.

KLEIN, S. L. Immune cells have sex and so should journal articles. **Endocrinology**,

v. 153, n. 6, p. 2544–2550, 2012.

KLEIN, S. L.; FLANAGAN, K. L. Sex differences in immune responses. **Nature Reviews Immunology**, v. 16, n. 10, p. 626–638, 2016.

KONJEVIĆ, G. et al. The Role of Activating and Inhibitory NK Cell Receptors in Antitumor Immune Response. **Natural Killer Cells**, 2017.

KRUSE, P. H. et al. Natural cytotoxicity receptors and their ligands. **Immunology and Cell Biology**, v. 92, n. 3, p. 221–229, 2014.

LANG, P. A. et al. Natural killer cell activation enhances immune pathology and promotes chronic infection by limiting CD8 + T-cell immunity. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 109, n. 4, p. 1210–1215, 2012.

LEE, J. et al. Natural killer cell activity for IFN-gamma production as a supportive diagnostic marker for gastric cancer. **Oncotarget**, v. 8, n. 41, p. 70431–70440, 2017.

LIBERT, C.; DEJAGER, L.; PINHEIRO, I. The X chromosome in immune functions: When a chromosome makes the difference. **Nature Reviews Immunology**, v. 10, n. 8, p. 594–604, 2010.

LIU, J.; CAO, X. Cellular and molecular regulation of innate inflammatory responses. **Cellular and Molecular Immunology**, v. 13, n. 6, p. 711–721, 2016.

LOZA, M. J.; PERUSSIA, B. Final steps of natural killer cell maturation: A model for type 1-type 2 differentiation? **Nature Immunology**, v. 2, n. 10, p. 917–924, 2001.

MACE, E. M.; ORANGE, J. S. Emerging insights into human health and NK cell biology from the study of NK cell deficiencies. **Immunol Rev.**, v. 176, n. 1, p. 202–225, 2019.

MANDAL, A.; VISWANATHAN, C. Natural killer cells: In health and disease. **Hematology/ Oncology and Stem Cell Therapy**, v. 8, n. 2, p. 47–55, 2015.

MANDELBOIM, O. et al. Human CD16 as a lysis receptor mediating direct natural killer cell cytotoxicity. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 96, n. 10, p. 5640–5644, 1999.

MARCUS, A. et al. **Recognition of tumors by the innate immune system and natural killer cells.** [s.l: s.n.]. v. 122. 2014.

MARKLE, J. G.; FISH, E. N. Sex matters in immunity. **Trends in Immunology**, v. 35, n. 3, p. 97–104, 2014.

MÁRQUEZ, E. J. et al. Sexual-dimorphism in human immune system aging. **Nature Communications**, v. 11, n. 1, 2020.

MATTIOLA, I. et al. Priming of Human Resting NK Cells by Autologous M1

Macrophages via the Engagement of IL-1 $\beta$ , IFN- $\beta$ , and IL-15 Pathways. **The Journal of Immunology**, v. 195, n. 6, p. 2818–2828, 2015.

MOLFETTA, R. et al. Regulation of NKG2D-dependent NK Cell functions: The Yin and the Yang of receptor endocytosis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 8, 2017.

MORIMOTO, K.; NAKAJIMA, K. Role of the Immune System in the Development of the Central Nervous System. **Frontiers in Neuroscience**, v. 13, n. September, 2019.

MORRISON, B. J.; STEEL, J. C.; MORRIS, J. C. Reduction of MHC-I expression limits T-lymphocyte-mediated killing of Cancer-initiating cells. **BMC Cancer**, v. 18, n. 1, p. 1–10, 2018.

NABATANZI, R. et al. Aberrant natural killer (NK) cell activation and dysfunction among ART-treated HIV-infected adults in an African cohort. **Clinical Immunology**, v. 201, n. January, p. 55–60, 2019.

O'SULLIVAN, T. et al. Cancer immunoediting by the innate immune system in the absence of adaptive immunity. **Journal of Experimental Medicine**, v. 209, n. 10, p. 1869–1882, 2012.

OLIVEIRA, A. D. A.; JANEIRO, R. DE. Alterações das células natural killer ( NK ) na síndrome mielodisplásica ( SMD ). 2011.

ORANGE, J. S. Natural killer cell deficiency. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 132, n. 3, p. 515–525, 2013.

ORR, M. T. et al. Development and function of CD94-deficient natural killer cells. **PLoS ONE**, v. 5, n. 12, 2010.

PAPANIKOLAOU, I. S. et al. Tissue detection of natural killer cells in colorectal adenocarcinoma. **BMC Gastroenterology**, v. 4, p. 1–4, 2004.

PAUL, S.; LAL, G. The molecular mechanism of natural killer cells function and its importance in cancer immunotherapy. **Frontiers in Immunology**, v. 8, n. SEP, 2017.

PAZMANY, L. Do NK cells regulate human autoimmunity? **Cytokine**, v. 32, n. 2, p. 76–80, 2005.

PETITDEMANGE, C. et al. Longitudinal Analysis of Natural Killer Cells in Dengue Virus-Infected Patients in Comparison to Chikungunya and Chikungunya/Dengue Virus-Infected Patients. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 3, p. 1–17, 2016.

POLI, A. et al. CD56bright natural killer (NK) cells: An important NK cell subset. **Immunology**, v. 126, n. 4, p. 458–465, 2009.

PROLO, P. et al. Physiologic modulation of natural killer cell activity as an index of Alzheimer's disease progression. **Bioinformatics**, v. 1, n. 9, p. 363–366, 2007.

RONDAY, H. K. et al. Human granzyme B mediates cartilage proteoglycan degradation and is expressed at the invasive front of the synovium in rheumatoid arthritis. **Rheumatology**, v. 40, n. 1, p. 55–61, 2001.

RUGGIERI, A. et al. The influence of sex and gender on immunity, infection and vaccination. **Ann Ist Super Sanità**, v. 47, n. 4, p. 363–372, 2016.

SARAIVA, M.; O’GARRA, A. The regulation of IL-10 production by immune cells. **Nature Reviews Immunology**, v. 10, n. 3, p. 170–181, 2010.

SCOVILLE, S. D.; FREUD, A. G.; CALIGIURI, M. A. Modeling human natural killer cell development in the era of innate lymphoid cells. **Frontiers in Immunology**, v. 8, n. MAR, p. 4–11, 2017.

SHEMESH, A. et al. Nkp44 and Nkp30 splice variant profiles in decidua and tumor tissues: A comparative viewpoint. **Oncotarget**, v. 7, n. 43, p. 70912–70923, 2016.

SIERRA, H. et al. Confocal imaging-guided laser ablation of basal cell carcinomas: An ex vivo study. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 135, n. 2, p. 612–615, 2015.

SIMON, A. K.; HOLLANDER, G. A.; MCMICHAEL, A. Evolution of the immune system in humans from infancy to old age. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 282, n. 1821, 2015.

SMYTH, M. J. NK cells and NKT cells collaborate in host protection from methylcholanthrene-induced fibrosarcoma. **International Immunology**, v. 20, n. 4, p. 631, 2008.

SPEZIALI, E. et al. Production of interferon- $\gamma$  by natural killer cells and aging in chronic human schistosomiasis. **Mediators of Inflammation**, v. 13, n. 5–6, p. 327–333, 2004.

STABILE, H. et al. Multifunctional human CD56<sup>low</sup>CD16<sup>low</sup>natural killer cells are the prominent subset in bone marrow of both healthy pediatric donors and leukemic patients. **Haematologica**, v. 100, n. 4, p. 489–498, 2015.

STRAUB, R. H.; CUTOLO, M. Involvement of the hypothalamic–pituitary–adrenal/gonadal axis and the peripheral nervous system in rheumatoid arthritis. **Arthritis Rheum**, v. 44, n. 3, p. 493–507, 2001.

STRAUB, R. H. et al. Serum dehydroepiandrosterone (DHEA) and DHEA sulfate are negatively correlated with serum interleukin-6 (IL-6), and DHEA inhibits IL-6 secretion from mononuclear cells in man in vitro: Possible link between endocrinosenescence and immunosenescence. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 83, n. 6, p. 2012–2017, 1998.

TANAKA, J. et al. Differential expression of natural killer cell receptors (CD94/NKG2A) on T cells by the stimulation of G-CSF-mobilized peripheral blood

mononuclear cells with anti-CD3 monoclonal antibody and cytokines: A study in stem cell donors. **Transplantation Proceedings**, v. 36, n. 8, p. 2511–2512, 2004.

THANAPATI, S.; DAS, R.; TRIPATHY, A. S. Phenotypic and functional analyses of NK and NKT-like populations during the early stages of chikungunya infection. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, n. SEP, p. 1–11, 2015.

THANAPATI, S.; GANU, M. A.; TRIPATHY, A. S. Differential inhibitory and activating NK cell receptor levels and NK/NKT-like cell functionality in chronic and recovered stages of chikungunya. **PLoS ONE**, v. 12, n. 11, p. 7–11, 2017.

TOPHAM, N. J.; HEWITT, E. W. Natural killer cell cytotoxicity: How do they pull the trigger? **Immunology**, v. 128, n. 1, p. 7–15, 2009.

VITALE, M. et al. NKp44, a novel triggering surface molecule specifically expressed by activated natural killer cells, is involved in non-major histocompatibility complex-restricted tumor cell lysis. **Journal of Experimental Medicine**, v. 187, n. 12, p. 2065–2072, 1998.

WILLENBRING, R. C.; JOHNSON, A. J. Finding a balance between protection and pathology: The dual role of perforin in human disease. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 8, p. 1–18, 2017.

WINDSOR, M. T. et al. Cytokine responses to acute exercise in healthy older adults: The effect of cardiorespiratory fitness. **Frontiers in Physiology**, v. 9, n. MAR, p. 1–8, 2018.


ZÁRATE, S.; STEVNSNER, T.; GREDILLA, R. Role of estrogen and other sex hormones in brain aging. Neuroprotection and DNA repair. **Frontiers in Aging Neuroscience**, v. 9, n. DEC, p. 1–22, 2017.

ZWIRNER, N. W.; ZIBLAT, A. Regulation of NK cell activation and effector functions by the IL-12 family of cytokines: The case of IL-27. **Frontiers in Immunology**, v. 8, n. JAN, 2017.

**ANEXOS**

## ANEXOS

### ANEXO A – Parecer da aprovação emitido pelo Comitê de Ética em Pesquisa

<div style="display: flex; justify-content: space-between; align-items: center;"> <div style="text-align: center;"> <b>COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA</b> </div> <div style="text-align: right;">  </div> </div>
---

#### PARECER CONSUBSTANCIADO DA CONEP

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Estudos das infecções causadas pelos vírus da Zika, Chikungunya e Dengue

**Pesquisador:** Tatjana Keesen de Souza Lima Clemente

**Área Temática:** Genética Humana:

(Haverá envio para o exterior de material genético ou qualquer material biológico humano para obtenção de material genético, salvo nos casos em que houver cooperação com o Governo Brasileiro;);

(Haverá armazenamento de material biológico ou dados genéticos humanos no exterior e no País, quando de forma conveniente com instituições estrangeiras ou em instituições comerciais;);

Pesquisas com coordenação e/ou patrocínio originados fora do Brasil, excetuadas aquelas com copatrocínio do Governo Brasileiro;

**Versão:** 4

**CAAE:** 59833416.8.0000.5183

**Instituição Proponente:** Hospital Universitário Lauro Wanderley/UFPB

**Patrocinador Principal:** National Institutes of Health (NIH)

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 2.117.372

#### Apresentação do Projeto:

##### INTRODUÇÃO

Os vírus que causam a Dengue, a Zika e a Chikungunya pertencem ao grupo dos arbovírus, vírus transmitidos por artrópodes, da ordem díptera. São vírus que permanecem na natureza em ciclos complexos envolvendo um ou mais vertebrados-reservatórios, que podem ser humanos ou animais domésticos, e insetos vetores que infectam-se após o repasto sanguíneo do vertebrado virêmico, transmitindo o vírus a outros vertebrados (após período de incubação extrínseca necessária). Dentro desse grupo temos vírus classificados em diferentes grupos (Togaviridae, Flaviviridae, Bunyaviridae, Reoviridae, Rhabdoviridae). Os vírus da Dengue (DENV) e da Zika (ZIKV) estão incluídos na família Flaviviridae que é composta por três gêneros: O gênero Flavivirus (no qual estão agrupados os quatro sorotipos dos Vírus Dengue (DENV 1-4), o Zika Vírus, Vírus da Febre Amarela, Vírus do Oeste do Nilo e da Encefalite Japonesa), o gênero Pestivirus no qual inclui-se os vírus da diarreia bovina e da peste suína clássica, e o gênero Hepacivirus, no qual

<b>Endereço:</b> SEPN 510 NORTE, BLOCO A 3º ANDAR, Edifício Ex-INAN - Unidade II - Ministério da Saúde	
<b>Bairro:</b> Asa Norte	<b>CEP:</b> 70.750-521
<b>UF:</b> DF	<b>Município:</b> BRASÍLIA
<b>Telefone:</b> (61)3315-5878	<b>E-mail:</b> conep@saude.gov.br

## ANEXO B – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA  
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

**Título do Projeto:** Avaliação da resposta imune humana inata e adaptativa nas arboviroses:

Correlação entre mecanismos celulares e prognóstico na infecção pelos vírus Zika, Chikungunya e dengue

**Pesquisadora:** Tatjana Keesen de Souza Lima

#### **I. Esclarecimentos**

Estamos convidando você para participar como voluntário de uma pesquisa sobre a Zika, Chikungunya e Dengue, que são doenças causadas por um microorganismo (micróbio) transmitido para o ser humano através da picada do mosquito, que se chama *Aedes aegypti*. Nosso objetivo com essa pesquisa é avaliar porque existem pessoas que ficam mais doentes que as outras quando estão com essas doenças e comparar a diferença entre elas; por exemplo, algumas podem ter hemorragia (sangramento intenso) no caso da dengue, dores articulares mais fortes na Chikungunya e manchas avermelhadas parecidas com alergia no caso da Zika. Outras pessoas apresentam a doença apenas com sintomas leves como febre, dores musculares, dor de cabeça, entre outros, que podem confundir o diagnóstico, por serem muito parecidas. Para isto, vamos realizar um estudo do seu sistema de defesa (imunológico), no qual serão analisadas as células que são capazes de defender o organismo contra o microorganismo que causa a Zika, a Chikungunya e a dengue.

Caso aceite participar do estudo você fará uma consulta médica e deverá permitir a realização da coleta do seu sangue. Além disto, você deverá autorizar o nosso acesso a sua ficha médica, para que possamos coletar informações sobre o estado atual da sua doença e os resultados dos exames realizados. Você também deverá responder um questionário a respeito da sua saúde. Quando você estiver respondendo esse questionário se alguma pergunta lhe causar constrangimento você poderá deixar de respondê-la. Esses procedimentos se justificam pelo fato da avaliação médica, as informações acerca do seu estado de saúde e também das informações que constarão no questionário, nos permitir incluí-lo no grupo de pessoas doentes ou saudáveis, visando uma correta distribuição e análise dos resultados obtidos.

Vamos a seguir, explicar a você para que utilizaremos o material biológico e os riscos e desconforto que poderão existir.

Todos os procedimentos estarão de acordo com as Resoluções do Conselho Nacional de Saúde. Com sua permissão serão coletados, por uma pessoa devidamente treinada, aproximadamente 15 mL do seu sangue; utilizando material estéril e descartável. Os riscos e desconfortos que você correrá nessa coleta são mínimos e poderão ser desmaio, sangramentos, manchas arroxeadas ou infecção no local da coleta. Entretanto iremos minimizar estes riscos com cuidados na realização deste procedimento, que são a limpeza no local da coleta através da utilização de álcool e pressionando a região do braço onde foi feita a coleta com algodão por alguns minutos, após a retirada da agulha. Com o sangue coletado iremos realizar um exame das células do seu



#### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

sangue (hemograma), para determinar se você tem anemia. Uma parte do seu sangue será armazenada a uma temperatura que permita a conservação das células em um equipamento direcionado para esse fim. A outra parte do seu sangue iremos utilizar para estudar seu sistema de defesa (sistema imunológico), como também faremos uma análise para confirmar se você tem Zika, Chikungunya ou Dengue. Além disso, será realizado o estudo farmacológico da riparina, uma substância isolada de uma planta, que quando colocada em contato com o seu sangue poderá atuar de maneira positiva, ativando o seu sistema de defesa a combater melhor a infecção. Essa abordagem permitirá a proposição futura de novas estratégias de diagnóstico e tratamento e associações terapêuticas, visando à melhoria da qualidade de vida dos portadores dessas doenças. Após a realização dos ensaios seu material biológico será descartado.

Com a sua autorização, uma parte do material biológico, o que foi acondicionado de maneira adequada para manutenção das células, será enviada para outro país (Inglaterra), onde os pesquisadores de lá farão estudos de substâncias no sangue que podem influenciar na resposta do seu sistema de defesa (imunológico). Após a realização dos ensaios seu material biológico será descartado.

Sua participação é voluntária, o que significa que você poderá desistir a qualquer momento, retirando seu consentimento, para a guarda e utilização do material biológico sem que isso lhe traga nenhum prejuízo ou penalidade. Para erradicar qualquer risco de vazamentos dados dos prontuários e questionários aplicados serão guardados em local seguro, conhecido apenas pela equipe brasileira envolvida na pesquisa. A amostra será armazenada como biorepositório, que é um tipo de armazenamento das suas amostras, somente no tempo de execução deste projeto. Também garantimos que, o seu sangue que irá para Inglaterra, será utilizado apenas para este estudo e, em seguida, descartados.

Todos os seus dados serão confidenciais e colocados de maneira anônima por devida codificação dos seus dados (ARBXX). Todas as informações do seu prontuário e questionários serão depositadas em um banco de dados (drive), cuja senha só terá acesso os pesquisadores envolvidos. Só após essa codificação é que o seu material biológico será encaminhado à Inglaterra. Garantimos que todas as informações obtidas serão sigilosas e seu nome não será identificado em nenhum momento. Os dados serão guardados em local seguro e a divulgação dos resultados será feita de forma a não identificar os voluntários. Também é importante assegurar que caso você tenha interesse nos resultados de exames e da pesquisa basta solicitar ao pesquisador responsável.

Os benefícios da sua participação nesta pesquisa são que você estará contribuindo para um melhor entendimento da doença, e com estudos que podem trazer a descoberta de novos tratamentos e/ou cura. Dessa maneira, contribuindo com a ciência e a comunidade à sua volta.

Sua participação nesta pesquisa é voluntária. Você não será pago por participar do estudo. No entanto, caso você tenha algum gasto, como por exemplo, com transporte e alimentação, você será ressarcido. Caso sofra algum dano decorrente da pesquisa (direto ou indireto, imediato ou tardio), você terá direito à assistência integral e imediata pelo tempo que for necessário, além do direito de buscar indenização.

Você receberá uma via deste documento devidamente assinada pelo pesquisador e por você e rubricada em todas as páginas por ambos. Toda dúvida que você tiver a respeito desta pesquisa, poderá entrar em contato com a pesquisadora Dr<sup>a</sup> Tatjana Keesen de Souza Lima Clemente, no Centro de Biotecnologia,

# TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Departamento de Biologia Celular e Molecular da Universidade Federal da Paraíba, Cidade Universitária- João Pessoa - PB - Brasil - CEP: 58051-900 Fone: (83) 3216-7371.

Dúvidas a respeito de questões éticas desta pesquisa poderão ser esclarecidas junto ao Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da UFPB. O Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) é um colegiado interdisciplinar e independente, que existe nas instituições que realizam pesquisas envolvendo seres humanos no Brasil, criado para defender os interesses dos sujeitos em sua integridade e dignidade e para contribuir no desenvolvimento da pesquisa dentro dos padrões éticos. Endereço: Hospital Universitário Lauro Wanderley-HULW- 2º andar (ao lado da biblioteca) Horário do Expediente: 8:00 às 12:00 hs e 13:00 às 17:00 hs. Campus I-Cidade Universitária-Bairro: Castelo Branco-CEP:58059-900-João Pessoa-PB- FAX (083) 32167522- CNPJ:24098477/007-05- Telefone: (083) 32167964- E-mail:comitedeetica@hulw.ufpb.br.

Além do CEP, também existe o CONEP - A Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – que é responsável por examinar os aspectos éticos de pesquisas envolvendo seres humanos, nas seguintes áreas: Genética humana, reprodução humana, novos dispositivos para a saúde, pesquisas em populações indígenas, pesquisas conduzidas do exterior e aquelas que envolvam aspectos de biossegurança. Endereço: Esplanada dos Ministérios, Bloco G, Anexo B. Sala 104B. Brasília-DF, CEP: 70.058-900. Fone: (61) 3315-3821 / 3315-2151 / 3315-3566. e-mail: cns@saude.gov.br

Você, ou alguém que você indique em caso de óbito ou condição incapacitante, terá o acesso gratuito a todas as informações e resultados associados a seu material biológico, inclusive informações genéticas que possam implicar riscos para doenças não preveníveis ou familiares. Quando tiver necessidade você também terá aconselhamento genético gratuito. É importante afirmar que os seus dados genéticos são confidenciais e que não serão repassados a terceiros. Todas as suas informações genéticas serão guardadas de forma anônima de maneira codificada em um banco de dados guardado por senha. Apenas os pesquisadores envolvidos terão acesso a essas informações.

Declaro que compreendi os objetivos desta pesquisa, como ela será desenvolvida, os riscos e benefícios envolvidos, bem como os meus direitos, e concordo em participar voluntariamente do estudo “Estudos das infecções causadas pelos vírus da Zika, Chikungunya e Dengue” autorizando o uso do meu sangue para a realização deste estudo.

Participante da pesquisa: (assinatura ou impressão datiloscópica):

\_\_\_\_\_ data \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Voluntário:

\_\_\_\_\_ data \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Pesquisador